

From the Department of Zoology, Columbia University, New York

CHROMATID AUTONOMY IN BANASA
(HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) *

By

FRANZ SCHRADER and SALLY HUGHES-SCHRADER

With 54 Figures in the Text

(Eingegangen am 10. April 1958)

I. Introduction

The chromosome conditions in more than a hundred species of the Tribe *Pentatomini* have been recorded so far. A great majority of them, roughly 85%, has a diploid complement of 14 chromosomes (6 pairs of autosomes and 2 sex chromosomes) which is obviously the type number of the Tribe as it is represented today in the various regions of the earth. Only two species have been reported as having more than 16 chromosomes. These are *Thyanta calceata* and *Banasa calva*, both of which carry twice as many autosomes as are present in the type complement.

So striking a departure from the usual number poses certain questions concerning its evolution, and in a previous publication (SCHRADER and HUGHES-SCHRADER 1956) we have suggested that the doubling of the autosome number in *Thyanta calceata* is not due to fortuitous fragmentation, or to polyploidization as ordinarily conceived, but results from a separation and individuation of the two chromatids comprising each chromosome. The present paper extends the investigation to the genus *Banasa* in which not only *Banasa calva* but also a number of other species recently discovered contribute information on the question of chromatid autonomy as one of the underlying factors in the alteration of chromosome number.

II. Material and Methods

Ten species of *Banasa* were studied, and one of these is represented by two geographical races. Three of the species are found in the temperate zone of North America and have not been recorded south of the United States. The remaining seven are primarily tropical in habitat. In Table 1 our collection localities are given with some exactness since certain of the species are subject to some geographical varia-

* This investigation was supported in part by research grant G-4370 from the National Institutes of Health, Public Health Service.

tion. Thus *Banasa dimidiata* may vary considerably in its coloration in different localities, and SAILER found that the *Banasa bidens* collected in Costa Rica shows distinct structural differences from examples of the same species found in Panama as well as those from Trinidad (which is the type locality). As will be seen, these differences are not reflected in the cytology of the two races just mentioned, but there is some

Table 1

Species	Collecting Locality
<i>Banasa dimidiata</i> SAY	Ellendale Swamp, Delaware; Tenafly, New Jersey; Bear Mountain, New York; Pasque Island, Massachusetts: USA
<i>Banasa euchlora</i> STAL	Crozier, Virginia: USA
<i>Banasa calva</i> SAY	Storrs, Connecticut: USA
<i>Banasa lenticularis</i> UHLER	Barro Colorado Island, Panama
<i>Banasa rufifrons</i> SAILER	Barro Colorado Island, Panama
<i>Banasa minor</i> SAILER	Barro Colorado Island, Panama
<i>Banasa zeteki</i> SAILER	Barro Colorado Island, Panama
<i>Banasa panamensis</i> SAILER	Barro Colorado Island, Panama
<i>Banasa centralis</i> SAILER	Siquirres, Costa Rica
<i>Banasa bidens schraderi</i> SAILER	Turrialba, Costa Rica; Barro Colorado Island, Panama

indication that in specimen of *Banasa calva* collected in Arizona the sex chromosomes differ slightly in size from those of the *Banasa calva* collected in Connecticut.

The cytological study of the various species was made on testes and ovaries fixed with Sanfelice, except in the case of *B. zeteki*, of which only Carnoy-fixed material was available. For all species the Feulgen technique as well as Heidenhain's haematoxylin method were employed in staining, and sections were used exclusively. The drawings were made with a camera lucida; their magnification as reproduced is indicated by a scale on each.

Cytophotometric measurements of the nuclear content of DNA (deoxyribose nucleic acid) in nine of the ten species were made with the apparatus and methods previously described (ANSLEY 1954; HUGHES-SCHRADER and SCHRADER 1957). Primary spermatocytes in the confused stage of prophase were chosen for measurement, since they proved uniform in morphology throughout the series of species, are nearly spherical in form and have the diffuse distribution of chromatin requisite for this technique. The testes were fixed in CARNOY's absolute alcohol-acetic (3:1), except in the case of *B. bidens schraderi* from Costa Rica of which only Sanfelice-fixed material was available. Correction for the differential effect of this fixative on the intensity of the Feulgen reaction was made as follows: The testes of a *B. euchlora* male were fixed, one in Carnoy and one in Sanfelice; the DNA content of the nuclei was compared cytophotometrically, and the ratio of the means

applied as a correction factor to the individual nuclear values obtained from Sanfelice-fixed testes of *B. bidens schraderi*. STOWELL's Feulgen procedure was followed throughout; the optimum duration of hydrolysis (determined cytophotometrically for each species) was 8 minutes for Carnoy-fixed material in all but one species, *B. zeteki*, in which the peak of the hydrolysis curve was reached at 6 minutes. As in previous studies (HUGHES-SCHRADER and SCHRADER 1956, 1957) frog liver nuclei were mounted on all slides together with the testes to be compared and served as a standard of reference for the detection and correction of any differences in the Feulgen reaction among the slides used for measurements; the *Banasa* data may thus be directly compared with our results on other *Pentatomini*.

We stand in great debt to Dr. REECE I. SAILER, of the U.S. Department of Agriculture, who has not only checked our identification of the known species of *Banasa* collected by us but has also described and named the five new ones that are included in our investigation (SAILER 1957, 1958). To Professors R. M. DECOURSEY and N. T. DAVIS of the University of Connecticut we owe thanks for their effective aid in collecting specimen of the uncommon *Banasa calva*.

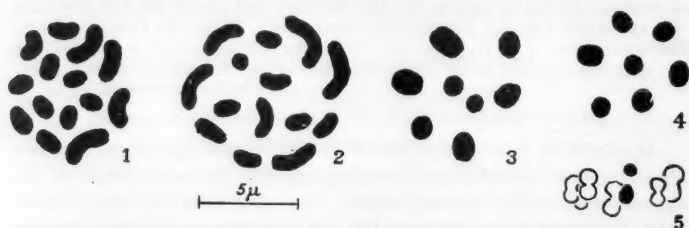
III. Cytology

It should be pointed out that although spermatogonial metaphases offer the best opportunity for comparing the size and shape of the chromosomes within a complement, they give only an approximate basis for comparisons between the chromosomes of different species. This stems from the fact that not only do the chromosomes of successive spermatogonial cell generations become progressively smaller and more condensed but these changes do not proceed at the same rate in the different species. In several of the 26-chromosome *Banasa* the later spermatogonial divisions show almost spherical chromosomes, whereas in others they never pass beyond the form of short rods. In all cases the chromosomes are more crowded in the later divisions and thereby less favorable for study (Figs. 24—26). In the young ovary of the 26-chromosome species, before the formation of definitive ova, the chromosomes do not assume the shortened form seen in spermatogonia but retain a more orthodox, elongate shape (Figs. 19 and 53).

At first meiotic metaphase the chromosomes seem to be close to the extreme degree of condensation in all the species of *Banasa*. They thus offer a better basis for interspecific comparisons of relative size, although here, too, there are disadvantages. As chromosomes and chromatids approach the spherical in form, small differences in size are difficult to determine with accuracy although they may represent a considerable difference in the volume of the chromosomes. Moreover, a slight tilting or shift in the orientation of a bivalent may affect its apparent size and shape, giving a more or less oval rather than circular outline in polar view.

Banasa panamensis

Except for the relatively small size of its chromosomes, this tropical species is in every aspect of its chromosome cytology a typical representative of the Tribe *Pentatomini*. Not only is it characterized by the type number of chromosomes, $2n = 14 = 12$ autosomes + 2 sex chromosomes, but the size relations of the chromosomes are in no way unusual. One pair of autosomes distinctly surpasses all the others, two pairs are somewhat smaller, and the three smallest pairs are difficult to distinguish from each other or from the X chromosome. In the male the Y chromosome is easily the smallest member of the complement and always recognizable on that basis alone (Fig. 2).



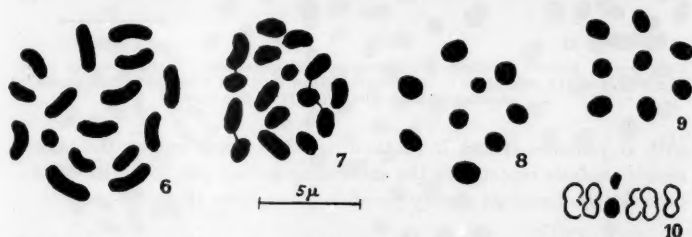
Figs. 1—5. *Banasa panamensis*. 1. Metaphase in young ovary; 14 chromosomes. 2. Spermatogonial metaphase; 14 chromosomes (16 cells in cyst). 3. Metaphase I, with X and Y in middle. Y is the smallest chromosome. 4. Metaphase II, with X and Y superimposed in middle. 5. Metaphase II in side view

The meiotic behavior, as observed in the male, is again quite typical. In the first metaphase the X and Y are usually, though by no means always, located side by side in the center of a ring formed by the autosomal bivalents (Fig. 3), and both divide equationally in this division. As the metaphase of the second division is formed, the X and Y undergo the characteristic "touch and go" pairing, followed by their passage to opposite poles. Since this pairing occurs at right angles to the equatorial plate and close to the polar axis, polar views of second metaphase usually show the two sex chromosomes superimposed on one another (Fig. 4) in the middle of the plate. This central position of the sex chromosomes is sufficiently constant as to be almost diagnostic, but in favorable side views their identification can be made with certainty, because of the "touch and go" pairing as well as the relative size of the Y. It should be remembered that here, as in all *Pentatomini*, the two sex chromosomes following an equational first division are present as single chromatids at second metaphase. In contrast, the autosomes are now represented by dyads, each of which comprises two chromatids, clearly demarcated from each other in side view (Fig. 5).

As noted above, in all these features *Banasa panamensis* conforms to that pattern of meiosis which is so typical of the Tribe *Pentatomini* as a whole.

Banasa euchlora

This is one of three species of *Banasa* which have added a pair of autosomes to the type complement represented in *B. panamensis*. Since *B. euchlora* has three, instead of two medium-sized pairs of autosomes, it is possible that one of them represents the extra chromosome. But the situation is not as simple as that, for additional differences



Figs. 6—10. *Banasa euchlora*. 6. Spermatogonial metaphase; 16 chromosomes (4 cells in cyst). 7. Spermatogonial metaphase (32 cells in cyst). 8. Metaphase I, with X and Y (smallest chromosome) in middle. 9. Metaphase II, with X and Y superimposed in middle. 10. Metaphase II in side view

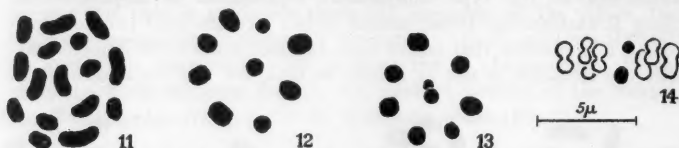
are detectable. Thus, the largest pair of autosomes is closer to the medium-sized ones in size, and among the three smallest pairs, one frequently appears smaller than the others (Figs. 6 and 7). In short, the alterations have comprised more than the mere addition of a chromosome pair; structural changes in more than one member of the type complement are indicated.

The change in chromosome number does not effect the general course of meiosis. A greater irregularity is observable in the configuration of the first metaphase, and in the second division there are more exceptions than normal to the rule that the XY pair occupies the central position in the plate. But just as in *B. panamensis*, the X is of approximately the same size as the smallest autosomes, while the Y is distinctly smaller (Fig. 10).

Banasa dimidiata

In its essential features this northern species was correctly analyzed by WILSON in 1907. Like the preceding species it has added one pair of autosomes to the typical pentatomine complement, but the changes involved do not correspond exactly to those observable in *B. euchlora*. Thus there are here two pairs of autosomes which exceed the others

in size but cannot be distinguished from one another. There are two other pairs only slightly smaller than these, and three pairs which are distinctly smaller while differing slightly from one another in size. The X is indistinguishable in size from these smaller autosomes, while the Y again stands out as the smallest member of the set. Noteworthy here is the general diminution in chromosome size, as compared both

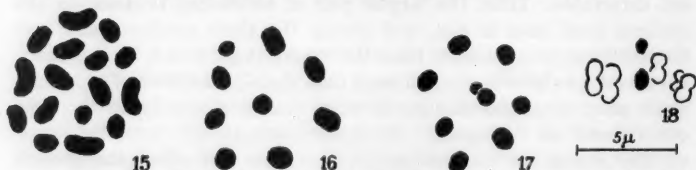


Figs. 11—14. *Banasa dimidiata*. 11. Spermatogonial metaphase; 16 chromosomes (4 or 8 cells in cyst). 12. Metaphase I. 13. Metaphase II, with X and Y in middle, only partially superimposed. 14. Metaphase II in side view

with *B. panamensis* and *B. euchlora*, which is borne out by the photometric analysis reported in the succeeding section (Fig. 54). In meiotic behavior *B. dimidiata* closely parallels *B. euchlora* (Figs. 12—14).

Banasa lenticularis

This third species to carry an extra pair of autosomes, although tropic in distribution, duplicates the features mentioned for *B. dimidiata*. Again the chromosomes appear smaller than those of *B. euchlora*, and



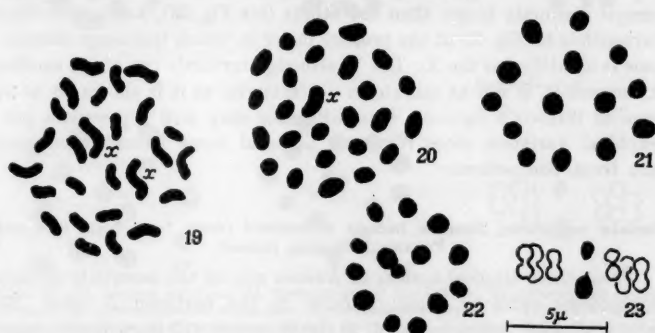
Figs. 15—18. *Banasa lenticularis*. 15. Spermatogonial metaphase; 16 chromosomes (16 cells in cyst). 16. Metaphase I. 17. Metaphase II, with X and Y in middle, only partially superimposed. 18. Metaphase II in side view

the nuclear content of DNA is similarly reduced (Figs. 15 and 54); the meiotic behavior again conforms closely to that of a typical pentatomine (Figs. 16—18). As in all the preceding species the X is indistinguishable in size from the smallest autosomes, whereas, the Y is readily identified as the smallest of the complement.

Banasa calva

This is the species in which WILSON in 1907 found a diploid complement of 26 chromosomes (12 pairs of autosomes + 2 sex chromosomes), a number which has not been reported for any of the numerous penta-

tomine species which have been investigated since that time. The 24 autosomes are distinctly smaller than those found in *Banasa* species with 14 and 16 chromosomes, but the sex chromosomes do not show a corresponding decrease in size. As a result, the X of *B. calva* is slightly larger than any other chromosome (Figs. 19 and 20) while the Y is so close to the smaller autosomes in size that it usually can not be distinguished from them in spermatogonial metaphases. This is an unusual situation in the Tribe *Pentatomini* and suggests rather fundamental changes in the chromosomal constitution.



Figs. 19—23. *Banasa calva*. 19. Metaphase in young ovary; 26 chromosomes. 20. Spermatogonial metaphase; 26 chromosomes (4 cells in cyst). 21. Metaphase I. 22. Metaphase II, with X and Y in middle only partially superimposed. 23. Metaphase II in side view (not all autosomes shown)

There is considerable difference in size between the largest and smallest autosomes of the complement, those of intermediate size being so closely gradated that a distinction among them cannot be made with certainty. In a general way they may be grouped as four large, four medium and four small pairs. It is an interesting fact that whereas even in the earliest spermatogonial metaphases the chromosomes tend to be short and, in extreme cases even spherical, the metaphase chromosomes in immature ovaries are distinctly thinner and longer (Fig. 19), a difference in form indicative of a tighter coiling in the male.

The behavior of the XY pair in male meiosis follows an orthodox course. It is difficult to recognize either of the sex chromosomes at first metaphase, since there are practically always more than two chromosomes in the center of the plate (Fig. 21). But in the second division, the XY can sometimes be recognized even in polar views, when either one or the other is shifted slightly out of the usual superimposed position (Fig. 22). Identification can of course be made with certainty in favorable side views, not only because of the characteristic

"touch and go" pairing but also because the X is larger than any one chromatid of the autosomal dyads (Fig. 23).

The analysis made of this species by WILSON in 1905 met with some difficulty because the material available to him consisted of the testes of an aberrant male. In his 1907 paper the numerical relations in normal material are given correctly, though WILSON believed the sex chromosomes to be of small size as they are in the other pentatomids that he had studied up to that time. As a matter of fact, his only drawing of a spermatogonial metaphase shows that one chromosome is distinctly larger than the others (his Fig. 2f), a situation that corresponds to Fig. 20 of the present paper in which this large chromosome is identified as the X. The Y, although certainly one of the smaller chromosomes, is not as minute in our material as it is shown to be in some of WILSON's figures. This difference may well represent a geographical variation since WILSON's material came from Arizona and ours from Connecticut.

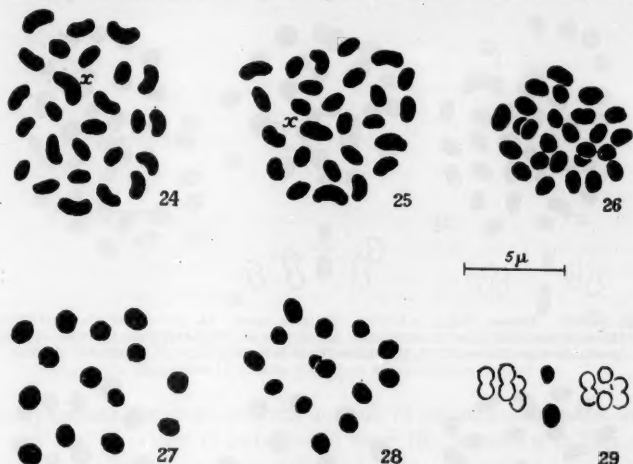
Banasa rufifrons*; *Banasa bidens schraderi* (races from Costa Rica and Panama); *Banasa minor

These three tropical species of *Banasa* are, in the essentials of their chromosome cytology, closely similar to the northern *B. calva*. All have a diploid complement of 26 chromosomes (12 pairs of autosomes + 2 sex chromosomes) (Figs. 24, 30, 34, 38). Similarly, in all, the X chromosome slightly exceeds in size even the largest autosome, and the Y is little, if any, smaller than the smallest autosomes. These size relations are most clearly seen in side views of the second spermatocyte metaphase (Figs. 29, 33, 37, 41), though the sex chromosomes can also be readily identified in polar views of this division if one of them has been shifted slightly out of the customary superimposition (Figs. 28, 36, 40).

As in *Banasa calva* the largest autosome can be readily distinguished but the others present so close a seriation in size that only a general grouping into large, medium and small autosomes can be made. The material of *B. rufifrons* shows many spermatogonial metaphases and demonstrates clearly what has already been noted in the 14- and 16-chromosome *Banasas* — the gradual diminution in chromosome size with succeeding spermatogonial divisions. But the diameter of the metaphase plate decreases out of proportion to chromosome size and the crowding which results makes counts of chromosomes in the later divisions difficult (Figs. 24—26).

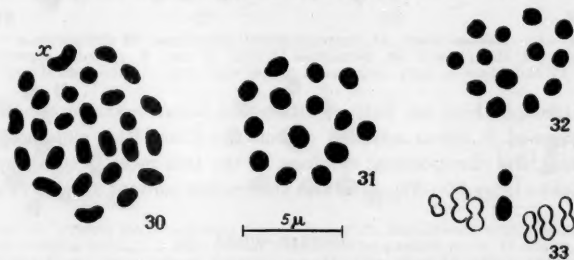
Again the meiotic behavior of the X and Y is quite orthodox and unaffected by the unusually high number of autosomes. But just as in *B. calva*, the spatial arrangement of the chromosomes at first meta-

phase is always rather irregular and though a circle of autosomal dyads is usually formed around the XY pair in the second division, one or



Figs. 24—29. *Banasa rufifrons*. 24. Spermatogonial metaphase; 26 chromosomes (4 cells in cyst). 25. Spermatogonial metaphase; 26 chromosomes (8 cells in cyst). 26. Spermatogonial metaphase; 26 chromosomes (64 cells in cyst). 27. Metaphase I. 28. Metaphase II with X and Y only partially superimposed. 29. Metaphase II in side view (not all autosomes shown)

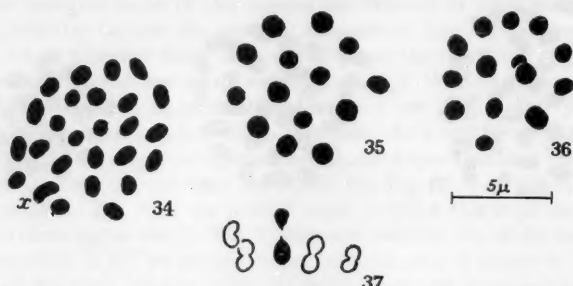
two autosomes — not always the same ones — are also frequently found within the circle (Figs. 28, 32, 36, 40). In short, the meiotic



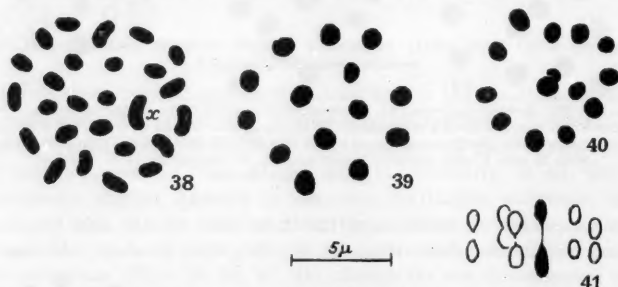
Figs. 30—33. *Banasa bidens schraederi* (Costa Rica race). 30. Spermatogonial metaphase; 26 chromosomes (16 cells in cyst). 31. Metaphase I. 32. Metaphase II. 33. Metaphase II in side view (not all autosomes shown)

metaphase configuration that is found in its typical form in the 14-chromosome *B. panamensis*, tends to become irregular in the 16-chromosome forms and is even more disordered in the 26-chromosome species.

This correlation between metaphase arrangement and chromosome number has been observed also in many other *Heteroptera*.



Figs. 34—37. *Banasa bidens schraderi* (Panama race). 34. Spermatogonial metaphase; 26 chromosomes (32 cells in cyst). 35. Metaphase I. 36. Metaphase II, with X and Y partially superimposed. 37. Metaphase II in side view (not all autosomes shown)



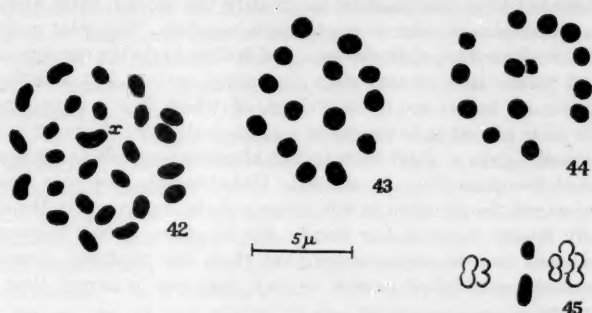
Figs. 38—41. *Banasa minor*. 38. Spermatogonial metaphase; 26 chromosomes (16 cells in cyst). 39. Metaphase I. 40. Metaphase II with X and Y partially superimposed. 41. Metaphase or early anaphase II in side view (not all autosomes shown)

Although there are distinct differences between the morphology of specimen of *B. bidens schraderi* collected in Costa Rica and those from Panama, the chromosomal cytology of the two races is to all appearance alike (Figs. 30—37), as is also the nuclear content of DNA (Fig. 54).

Banasa zeteki

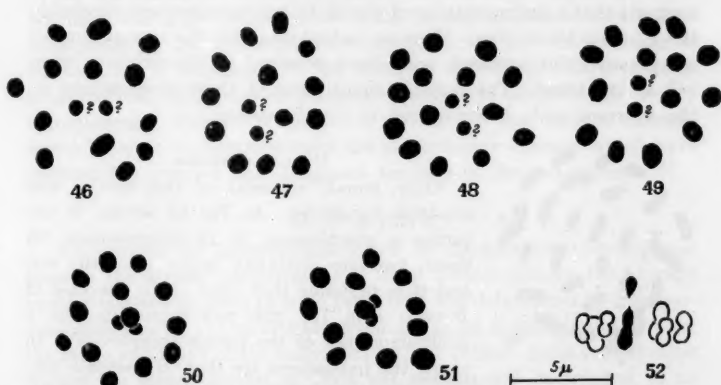
As Figs. 42—45 indicate, *Banasa zeteki* conforms in every essential feature to the preceding description of the other 26-chromosome species. However, one of the males in our collection shows a significant deviation from the normal chromosomal conditions. Unfortunately the testes of this male were preserved in CARNOY's fluid for cytophotometric use, and the resulting fixation is inadequate for a precise cytological analysis. No reliable counts of the spermatogonial chromosomes can be

made. It is clear, however, that no first meiotic metaphases showing the 12 autosomal bivalents and 2 sex chromosomes of the normal male



Figs. 42—45. *Banasa zeleki*. 42. Spermatogonial metaphase; 26 chromosomes (8 or 16 cells in cyst). 43. Metaphase I. 44. Metaphase II with X and Y partially superimposed. 45. Metaphase II in side view (not all autosomes shown)

occur; instead the great majority contain 15 chromosomal bodies, and a very few (5 among 72 metaphases) have 16. As shown in Figs. 46



Figs. 46—52. *Banasa zeleki* (aberrant male). 46 and 47. Metaphase I with 1 extra chromosome. Possible derivatives from normal Y indicated by question mark. 48 and 49. Metaphase I with 2 extra chromosomes. Possible derivatives from normal Y indicated by question mark. 50 and 51. Metaphase II with 3 instead of the normal 2 sex chromosomes, partially superimposed. 52. Metaphase II in side view with the 3 sex chromosome components serially aligned

and 47, the plates with 15 always contain 2 chromosomes of equal size, fairly close together and more or less centrally located, which are distinctly smaller than any chromosome in the first spermatocyte

of the normal male. An identical pair of small chromosomes is also present in the rare metaphases with 16 chromosomal bodies (Figs. 48 and 49) but it is not possible to identify the second extra element. Second metaphases occur in considerable numbers. The great majority show a configuration of 13 chromosomal bodies, as do the corresponding typical polar views of this stage in normal males. But actually 15 chromosomal bodies are present here, of which 3 are superimposed in the polar axis so as to appear as a single body from the polar aspect. In several figures a slight shift in this alignment reveals the 3 components of the chain (Figs. 50 and 51). Unfortunately, the poor fixation has obscured the situation in side views and the 3 elements in the chain usually appear more or less fused. Fig. 52 shows a rare instance in which they can be distinguished, but their size relations cannot be dependably established except to say that one is larger than the other two.

It is obvious that the 3 chromosomes which form a chain in the second division constitute a sex chromosome complex. Clearly this is a "touch and go" configuration in which the usual pair is replaced by a trio. That two of the three are alike in size and distinctly smaller than any chromosome present at first metaphase in a normal male suggests that a fragmentation of one of the sex chromosomes—probably the Y—has taken place. Since no metaphases with the normal number are present, this accident must have occurred in the primary germ cell at the latest. The possible significance of these observations on the aberrant male is considered in the discussion.

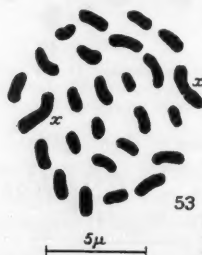


Fig. 53. *Banasa centralis*.
Oogonial metaphase

Banasa centralis

Only female material of this species was available for study. As Fig. 53 shows, it too carries a complement of 26 chromosomes. Of these, two are distinctly larger than the rest and it is probable that, just as in the case of *B. calva* (Fig. 19), this pair represents the 2 X chromosomes of the female complement. In short, the indications are that *B. centralis* corresponds to all the other 26-chromosome species in its cytology.

Size relations of sex chromosomes and autosomes

If the size of the sex chromosomes relative to that of the autosomes, as described above for the different species, be considered comparatively for the group as a whole, a significant relationship is apparent. In *B. panamensis* which alone retains the ancestral complement, these

size relations were shown to be those typical for the Tribe, i.e. — the X approximates the smallest autosome in size, while the Y is distinctly the smallest of the set. In *B. euchlora*, *B. dimidiata* and *B. lenticularis*, which have added one pair of autosomes to the type number, these size relations are retained. But in the remaining 6 species, in all of which the number of autosomes has been doubled, the size of the sex chromosomes as compared to that of the autosomes has been altered: here the X is the largest chromosome of the complement, and the Y approaches the smallest autosome in size. This is demonstrable in spermatogonial divisions but is most clearly evident at the second meiotic metaphase when the identity of the sex chromosomes is unmistakable. At this stage, it should be remembered, the X having divided equationally at the first division corresponds in valence to one chromatid of an autosomal dyad. Side views of second metaphase (Figs. 23, 29, 33, 41 and 45), in all the 26-chromosome species show the X to be as large as, or larger, than one chromatid of the largest autosome, and the Y to approximate in size a chromatid of the smaller dyads.

The explanation of this shift in relative size is to be sought, not in the sex chromosomes, but in the actual size of the autosomes. For a comparison of the complements of the 14- and 16-chromosome species with those of the 26-chromosome group shows that the doubling of the number of autosomes in the latter is associated with a decrease in autosomal size, whereas no such change has occurred in the sex chromosomes. The conclusion seems inescapable that the sex chromosomes have been exempted from the evolutionary changes which have doubled the number and decreased the size of the autosomes.

IV. DNA values

To provide an independent index of comparative chromosomal mass in the diverse complements of these *Banasa* species, the average nuclear content of DNA in male germ cells was determined by Feulgen-cytophotometry. The results are given in Fig. 54 as histograms showing the range and mean of the individual nuclear values. As in our previous studies the mean amount of DNA per nucleus will be referred to as the "DNA value" of the species. The point of major interest lies, of course, in the relative values of the species whose chromosome complements deviate from the ancestral tribal pattern — as compared with that of *Banasa panamensis* which retains it.

The DNA value of *B. panamensis*, with the type complement of 14 chromosomes, is 1.43 units, and thus proves to be practically identical with the average (1.47) DNA value of the six forms with 26 chromosomes — *B. minor*, the two races of *B. bidens schradleri*, *B. calva*,

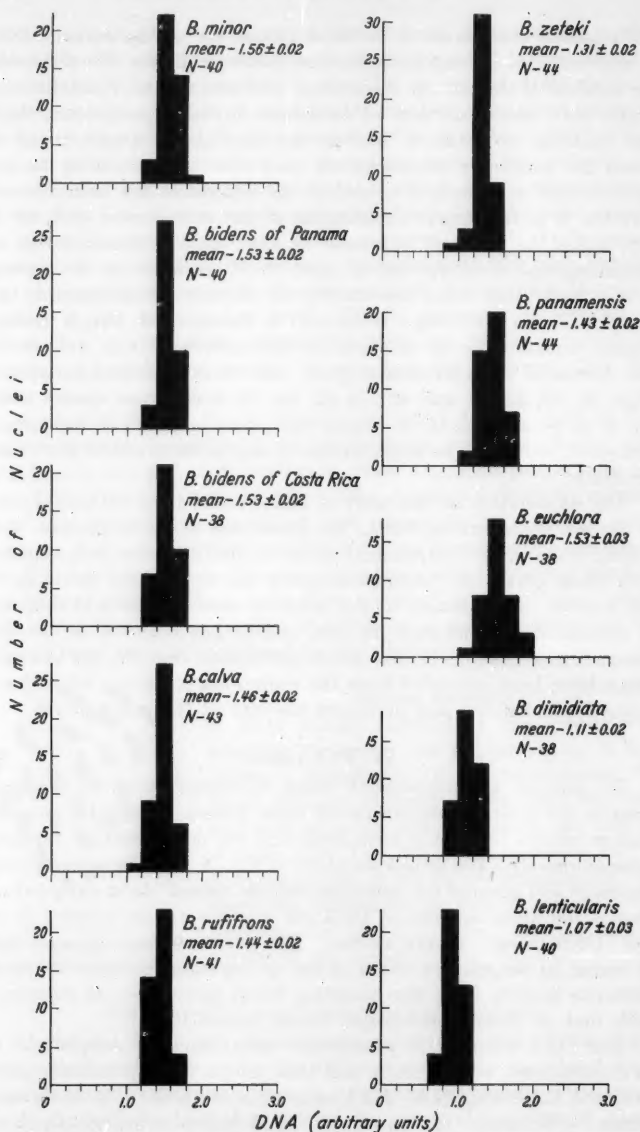


Fig. 54. DNA content of spermatocyte nuclei in the various species of *Banasa*.
 N = number of nuclei measured; mean \pm standard error

B. rufifrons and *B. zeteki*. The 26-chromosome group, as a comparison of the histograms shows, is remarkably uniform in DNA values, with the single exception of *B. zeteki*, in which the value falls to 1.31 — a deviation indicative of no major structural change. The two geographic races of *B. bidens schraderi* are indistinguishable in DNA values, as in their chromosome complements. The 16-chromosome species *B. euchlora* has a DNA value very close to that of *B. panamensis*, confirming the cytological evidence that little or no change in total chromosome mass has accompanied the structural rearrangements involved. In the other two 16-chromosome species, *B. dimidiata* and *B. lenticularis*, the DNA value is lower than that of *B. panamensis* by a factor of 23 percent. This reduction is reflected in chromosome size, but its nature remains obscure.

In summary, the DNA data show that evolutionary increase in chromosome number among the *Banasa* species is not associated with any significant increase in the nuclear content of DNA; the DNA values in the 26-chromosome and 16-chromosome species are either approximately the same as, or lower than in *B. panamensis* which retains the ancestral complement of 14 chromosomes.

V. General biological features

Brief consideration should be given to certain aspects of the general biology of a genus whose chromosomal features evince a much greater lability than is characteristic of the Tribe *Pentatomini*. Possibly this lability is also reflected in the unusually large number of species comprised by the genus. SAILER (1957) states that while there are now 25 named species of *Banasa*, the U.S. National Museum has at least 25 more that have not yet been described. It is safe to assume that this total of 50 will be greatly increased by future collections, and that *Banasa* will rank with, or exceed, such genera as *Euschistus* in number of species. With only a few exceptions these species are well demarcated from each other. In the few instances in which a casual examination of dried specimen might lead to confusion, a more detailed examination removes all doubt of the validity of the species, the differences being especially marked in the structure of the genitalia.

But if the high number of species and chromosomal variation denotes an evolutionary lability, other features connote marked stability. Thus in all the species here discussed, the testis comprises only 3 lobes instead of the 5, 6 or 7 that are commonly found in the *Pentatomini*. This exceptional feature (first noted in two *Banasa* species by BOWEN in 1921) is common to the widely scattered northern and tropical species alike, and must have arisen early in the evolution of the genus. Oddly enough, and contrary to the usual parallelism in gonadal structure

in the two sexes, the ovary retains the ancestral number of lobes, and all 4 of the species which we have examined relative to this point show 6 or 7 ovarioles in each ovary.

The peculiarities in the distribution of the species cannot yet be correlated with either the chromosomal data or the specific DNA values. As our Tables 1 and 2 show, the only species that conforms to the tribal type in chromosome number and behavior — *B. panamensis* — is tropical, and thus supports the taxonomists' belief that tropical America represents the center of distribution of the genus. Of the 3 species which have exceeded the type number by one pair of chromosomes, one (*B. lenticularis*) is tropical, while two (*B. euchlora* and *B. dimidiata*) are restricted to the temperate zone. Of the six 26-chromosome species, five are exclusively tropical in habitat, but the sixth (*B. calva*) is one of the 3 species which are not only restricted to the temperate zone but reach the northernmost limits of distribution for the genus.

The most successful, i.e. the most common, of all the species we know are two of the 16-chromosome forms (*B. dimidiata* and *B. lenticularis*). Both have the same exceptionally low DNA value, but neither this nor the chromosome number explains the relative prosperity of the species in our present state of knowledge. Nor is any light thrown on this aspect by the fact that one of these species is tropical while the other is confined to the temperate zone.

As noted above, it is more than likely that the *Banasa* species of the temperate zone originated in the tropics, directly or indirectly. But even the possession of so exceptional a complement as 26 chromosomes does not necessarily mean that the northern *B. calva* was derived directly from one of the tropical species with that same number of chromosomes. Though that would seem to be the best hypothesis it is nevertheless conceivable that the doubling of the number of autosomes involves some special structural feature that is common to the autosomes of all *Banasa* species and that the 26-chromosome complement has originated independently at different times.

Be that as it may, the present survey shows that the conservatism that is so characteristic of the chromosomal conditions in the Tribe *Pentatomini* is not shared by the genus *Banasa*. The quite considerable number of its species that have doubled the type number of autosomes and the evident prosperity of some of them (such as *B. bidens*) would seem to indicate that so large a departure from the orthodox chromosome complement has had no obvious detrimental effects.

VI. Discussion

Our results on chromosome number and DNA values in the genus *Banasa* (Table 2), show that evolutionary increase in chromosome

number is associated with no significant increase in DNA values. Even in the five species in which the autosomes have doubled in number, the DNA values remain approximately the same as, or lower than,

Table 2

Species	2 n	♂ chromosomes	DNA
<i>Banasa panamensis</i> . . .	14	12 + X + Y	1.43
<i>Banasa euchlora</i>	16	14 + X + Y	1.53
<i>Banasa dimidiata</i>	16	14 + X + Y	1.10
<i>Banasa lenticularis</i>	16	14 + X + Y	1.07
<i>Banasa calva</i>	26	24 + X + Y	1.46
<i>Banasa rufifrons</i>	26	24 + X + Y	1.44
<i>Banasa bidens schraderi</i> (Costa Rica)	26	24 + X + Y	1.53
<i>Banasa bidens schraderi</i> (Panama)	26	24 + X + Y	1.53
<i>Banasa minor</i>	26	24 + X + Y	1.56
<i>Banasa zeteki</i>	26	24 + X + Y	1.31
<i>Banasa centralis</i>	26	No male material available	—

in *B. panamensis* which alone retains the type number of the Tribe *Pentatomini*.

The nuclear content of DNA in the *Banasa* species is close to the lower limit reached in the Tribe *Pentatomini*. It varies from 1 to 1.5 units, as contrasted with the 3 to 4 found in the fairly closely related genus *Acrosternum* (HUGHES-SCHRADER and SCHRADER 1957). The significance of such wide diversity in DNA values within so restricted a taxonomic group has been discussed in our previous papers (loc. cit. and 1956). We have proposed that evolutionary change in the valence or level of polyteny in the individual chromosome has been a major factor in bringing about changes in DNA values of the magnitude encountered in the *Pentatomini*. This assumes, of course, that DNA is an integral component of the microfibril (or structural unit of the chromosome) and that its synthesis is in general restricted to the replication of these unit fibrillae. MIRSKEY and RIS (1951) reached similar conclusions from DNA data on certain vertebrate groups. Electron microscopy should soon provide direct and decisive evidence on the validity of this hypothesis. Indeed RIS (1957) has already shown a direct correlation between nuclear DNA values and the thickness of the loop in the lampbrush chromosomes of a series of *Amphibia*; granting the uniformity of the structural unit, differential polyteny is thereby demonstrated.

Of critical significance for the question of the evolutionary origin of the high-numbered complements in *Banasa* is the finding that the actual size of the autosomes in all 26 chromosome species is markedly reduced in comparison with the 14- and 16-chromosome species, while the sex chromosomes remain apparently unchanged throughout the whole series. This strongly suggests some evolutionary process of fragmentation from which the sex chromosomes have been exempt.

Such an immunity on the part of the sex chromosomes is at first glance surprising. For in the otherwise similar case of *Thyanta calceata* the X chromosome is represented twice in the complement, just as are the autosomes (SCHRADER and HUGHES-SCHRADER 1956); and in several other groups of *Heteroptera* — most markedly in the *Reduviidae* — it is especially the sex chromosomes which are subject to fragmentation. But there is reason to think that the structural or physiological conditions of sex chromosomes vary widely even within the subfamily *Pentatominae*. For besides the resistance to fragmentation of the X and Y in *Banasa*, there are such instances as *Brachystethus* and certain *Discocephalini* (SCHRADER 1946a and b) in which special conditions in certain cells strikingly alter the movements of the autosomes, whereas the X and Y are entirely unaffected.

There is, moreover, reason to expect that such immunity to change in the sex chromosomes is not confined to certain *Pentatominae*. Thus LORKOVIC (1941) reports that in several lepidopteran genera such as *Polyommatus*, certain species show a doubling and then a redoubling of the basic number of chromosomes. This is correlated with a progressive decrease in chromosome size in each successive multiple, but one chromosome of the set does not participate in this reduction and retains its original size. This unaltered chromosome may well be the sex chromosome as WHITE (1946) suggested some years ago; further work on this aspect is highly desirable. No explanation is as yet available for such differential reactions of the sex chromosomes in fairly closely related species but, restricting consideration to the more completely analyzed cases, there can be little doubt of the reality of the diversity.

While the foregoing considerations strongly suggest the evolutionary origin of the 26-chromosome complements in *Banasa* through some sort of autosomal fragmentation, the precise doubling of the number further implies a certain regularity in that process. As pointed out in the case of *Thyanta*, it would demand a great deal of coincidence to achieve the exact doubling of a comparatively high number of chromosomes through a series of accidents such as are comprised in non-disjunction, translocations, deletions etc. The fact that except for the few 16-chromosome species (— and here the cytological evidence indi-

cates an origin different from that of the 26-chromosome group —) no forms with intermediate numbers are known, and none are on record which have more than doubled the type number of autosomes, makes such an origin even less plausible.

While a rather precise doubling of chromosome number coupled with the absence of intermediates would ordinarily suggest polyploidization in the ancestral stock, this hypothesis meets with serious objections in the case of the 26-chromosome *Banasa* species. The most obvious of these lies in the fact that the doubling of the number of autosomes has occurred without significant change in DNA values, and has involved a decrease in autosomal size. To maintain the hypothesis of polyploidization in the face of these facts, one must assume a subsequent adjustment of the valence or level of polyteny in the individual chromosome. However, even if this be granted, it still remains unexplained how the sex chromosomes have not been affected in size and number.

In short, an explanation based on polyploidy encounters serious objections. Since the alternative of fortuitous structural rearrangements is unlikely to result in such precise multiples as are represented in *Thyanta* and *Banasa*, the intervention of some more orderly process of fragmentation is indicated. These considerations have led us to the hypothesis that the primary factor in the doubling of the chromosome number lies in a weakening of the bonds that ordinarily hold the two chromatids of each chromosome together. Their dissociation would double the number of chromosome elements without changing the nuclear content of DNA, and would at the same time result in a decrease in chromosome size. The establishment of chromatid autonomy would, moreover, involve no such drastic reorganization of the chromosomes as is usually postulated in cases involving a large evolutionary increase in chromosome number, and would thus constitute no marked departure from the general conservatism toward such changes which characterizes the *Pentatomini*. On the hypothesis of chromatid autonomy, cases such as *Thyanta calceata* and the 26-chromosome species of *Banasa* are alike explicable. In the former both sex chromosomes and autosomes have undergone a dissociation of chromatids, resulting in a complement indistinguishable except by its unchanged DNA content from tetraploidy as ordinarily understood. In the 26-chromosome *Banasa* species, on the other hand, only the autosomes have been involved.

In terms of the hypothesis of chromatid autonomy, the cytology of the aberrant male of *B. zeteki* is also explicable. It will be recalled that in this specimen the great majority of first spermatocytes carry an extra sex chromosome. The fact that 2 of the 3 sex chromosomes

are distinctly smaller than any chromosome of the normal set suggests that a fragmentation of one of the original sex chromosomes — probably the Y — has taken place. Further, the identity in size of these 2 small elements suggests their origin through a separation and individuation of chromatids, rather than through a transverse break. With the extension of chromatid autonomy to include one of the sex chromosomes, this aberrant male of *B. zeteki* achieves a status comparable to that of *Thyanta calceata*, but with an XY^1Y^2 instead of the X^1X^2Y of the latter species. It is tempting, on this line of reasoning, to interpret in this aberrant male those rare first spermatocytes which carry 2 extra chromosomes as due to an extension of chromatid autonomy to include the X as well as the Y. This possibility remains conjectural since the material is inadequate to establish the identity of the second extra element as a sex chromosome.

Chromatid autonomy, in varying degrees of expression, is a normal feature of the chromosome cycle in many animals — to a notable extent among the *Coccoidea* (review in HUGHES-SCHRADER 1948). In these cases the assumption of independent status and activity by the chromatids is limited to certain phases of the life cycle, — usually the meiotic period. But in the coccid *Pseudaulocaspis pentagona* both the cytological demonstration of numerical tetraploidy (BROWN and BENNETT 1957) and the cytochemical finding of a reduced amount of DNA per chromosome as compared with related diploid species (HUGHES-SCHRADER, 1957) suggest that an individuation of chromatids has here become established throughout the entire life cycle. This situation is thus fundamentally similar to that of *Thyanta calceata* and the 26-chromosome species of *Banasa*.

Although the diffuse kinetochore doubtless facilitates the establishment of chromatid autonomy, the latter is not restricted to organisms with holokinetic chromosomes, as the instances just cited might suggest. Thus, in certain euphyllopod *Crustacea* (GOLDSCHMIDT 1954) the chromatids of one or 2 chromosomes regularly become dissociated during the second meiotic division. And in the germ-line-limited chromosomes of the orthocladine chironomid *Psectrocladius* (BAUER and BEERMANN 1952) the two chromatids of each chromosome separate and pass through meiosis as independent entities. Again, chromatid autonomy may well underlie the curious chromosomal conditions reported by MELANDER (1950) in the crustacean *Ulophysema*. Here the basic somatic number ($2n$) appears to be 18, but 36 chromosomes are present at the first cleavage of the egg, and again in many mantle cells, while the spermatids carry 18 spatially distinct chromosomal bodies. Individuation of chromatids at various points in the cycle, followed by their reassociation to constitute the chromosomes of the basic set, seems to be

indicated. The cytological evidence is, however, incomplete and the case requires further analysis.

The formation from single chromosomes of structurally typical meiotic bivalents affords still another and different expression of chromatid autonomy. It has been reported in the oogenesis of parthenogenetic forms in such diverse groups as the ferns (MANTON 1950), the *Platyhelminthes* (MELANDER 1949; LEPORI 1949), and the *Lumbricidae* (OMODEO 1952; MULDAL 1952), and also in the majority of the orthocladine *Chironomidae* reported by BAUER and BEERMANN (1952). Still another and striking instance, in the apomictic *Allium odorum*, has recently been analyzed by HÅKANSSON and LEVAN (1957). They postulate that each chromosome undergoes an extra premeiotic endomitotic duplication, thereby explaining its subdivision into the four unit strands of the bivalent that would ordinarily result only from the pairing of two homologous chromosomes — a pairing which they consider to be inhibited by the progeny pairing in the "autobivalents". While an extra replication of the unit strands of the chromosomes must occur at some point in the cycle, since meiosis here comprises two equational divisions, its causal relation to the inhibition of pairing and segregation of homologues is not established. On the contrary, these meiotic maneuvers appear rather to be independent of the absolute valence of the chromosome, since the nuclear content of DNA in meiotic cells can be drastically reduced — even to one-half the normal amount — without interfering with a normal ratio of 4 to 2 to 1 in its distribution to primary spermatocytes, secondary spermatocytes and spermatids (LEUCHTENBERGER, SCHRADER, HUGHES-SCHRADER and GREGORY 1956). The chromosome is multistranded at all stages of its cycle; the organization of its component strands into "autobivalents" (without reference now as to what special conditions in the cell induce their formation) may be simply an expression of the structural and behavioral individuation of chromatids — of that potential for chromatid autonomy with which we are here concerned.

On the evidence reviewed above, and in particular that afforded by the 26-chromosome *Banasa* species, the dissociation and individuation of chromatids merits serious consideration as a mechanism in the evolutionary increase in chromosome number. Especially is this true with respect to the origin of autopolyploid races and species. The natural and generally accepted view is that autopolyploidy originates through the duplication of a basic chromosome complement, and this, at least at the time of origin, would involve a doubling of the DNA value. However, a numerical doubling may also be attained through chromatid autonomy which would leave unchanged the DNA value that obtained originally.

It is of course probable that both processes occur. Indeed it should be emphasized once more, as we have done in the past, that in *Banasa* as elsewhere, chromosomal changes of different kinds may be going on more or less simultaneously. Thus if chromatid autonomy and changes in polyteny have played a major role in the evolution of the different species of *Banasa*, there is no reason to presume that other types of alteration — such as are more usually considered — have not also occurred. Certainly in the 16-chromosome species the size relations among the autosomes within the complement give evidence of structural change brought about by transverse breaks and translocations.

Summary

1. Of the ten species of *Banasa* investigated, one has the typical chromosome complement of the Tribe *Pentatomini* ($2n = 12 + 2$ sex chromosomes); three have an extra pair of autosomes ($2n = 14 + 2$ sex chromosomes); and six have doubled the number of autosomes ($2n = 24 + 2$ sex chromosomes).

2. The autosomes in the 26-chromosome species of *Banasa* are distinctly smaller than in either the 14- or the 16-chromosome species, but the size of the sex chromosomes has undergone no such decrease.

3. In five of the species in which the number of autosomes has been doubled, the DNA value remains close to that found in the presumably more primitive species with 14 chromosomes. No DNA data are available for the sixth species.

4. It is concluded that the evidence argues against both polyploidy and an accumulation of random changes in chromosomal structure as primary factors in the evolution of the 26-chromosome species. It is proposed instead that the doubling of the autosome number is due to a separation and individuation of the two chromatids that compose each autosome.

5. The suggestion is made that both chromatid autonomy and polyteny have played important roles in the chromosomal evolution of many other species also. But it is emphasized that only rarely can these two factors be solely responsible for evolutionary changes; fortuitous alterations in chromosome structure as well as true polyploidy (especially in plants) have also been involved in arriving at the conditions as we see them today.

References

- ANSLEY, H. R.: A cytological and cytophotometric study of alternative pathways of meiosis in the house centipede (*Scutigera forceps* RAFINESQUE). *Chromosoma* 6, 656-695 (1954). — BAUER, H., and W. BEERMANN: Der Chromosomenzyklus der Orthocladini (Nematocera), *Diptera*. *Z. Naturforsch.* 7b, 557-563 (1952). — BOWEN, R. H.: Studies on insect spermatogenesis IV. *Proc. Amer.*

Acad. Arts Sci. 57, 391-423 (1922). — BROWN, S. W., and F. D. BENNET: On sex determination in the diaspine scale *Pseudaulacaspis pentagona* TARG (Coccidae). Genetics 42, 510-523 (1957). — GOLDSCHMIDT, E.: Abnormal chromosome behavior in fairy shrimp (*Euphyllipoda Anostraca*). Caryologia 6, Suppl., 781-784 (1954). — HÅKANSON, A., and A. LEVAN: Endo-duplicational meiosis in *Allium odorum*. Hereditas 43, 179-200 (1957). — HUGHES-SCHRADER, S.: Cytology of coccids (Coccoidea-Homoptera). Advanc. Genet. 2, 127-203 (1948). — Differential polyteny and polyploidy in diaspine coccids (Homoptera-Coccidae). Chromosoma 8, 709-718 (1957). — HUGHES-SCHRADER, S., and F. SCHRADER: Polyteny as a factor in the chromosomal evolution of the *Pentatomini* (Hemiptera). Chromosoma 8, 135-151 (1956). — The *Nezara* complex (*Pentatomidae-Heteroptera*) and its taxonomic and cytological status. J. Morph. 101, 1-24 (1957). — LEFORI, N. G.: Ricerche sulla ovogenesi e sulla fecondazione nella planaria *Polycelis nigra* EHRENBERG con particolare riguardo all'ufficiia del nucleo spermatico. Caryologia 1, 280-295 (1949). — LEUCHTENBERGER, C., F. SCHRADER, S. HUGHES-SCHRADER and P. W. GREGORY: Certain cytochemical and cytological aspects of dwarfism in cattle. J. Morph. 99, 481-512 (1956). — LORKOVI, Z.: Die Chromosomenzahlen in der Spermatogenese der Tagfalter. Chromosoma 2, 155-191 (1941). — MANTON, I.: Problems of cytology and evolution in the *Pteridophyta*. Cambridge 1950. — MELANDER, Y.: Cytological studies on Scandinavian flatworms belonging to *Tricladida*, *Paludicola*. Hereditas, Suppl., 1949 625-626. — Studies on the chromosomes of *Ulophysema öresundense*. Hereditas 36, 233-255 (1950). — MIRSKY, A. E., and H. RIS: The desoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance. J. gen. Physiol. 34, 451-462 (1951). — MULDAL, S.: The chromosomes of the earthworms I. Hereditas 6, 55-76 (1952). — OMODEO, P.: Cariologia dei *Lumbricidae*. Caryologia 4, 173-275 (1952). — RIS, H.: Chromosome structure. (In The Chemical Basis of Heredity.) 23-62. Baltimore 1957. — SAILER, R. I.: Two new species of *Banasa* from Central America (*Hemiptera: Pentatomidae*). Bull. Brooklyn ent. Soc. 52, 85-88 (1957). — Additional new species of *Banasa* from the Caribbean area. Bull. Brooklyn Ent. Soc. 53 (1958). — SCHRADER, F.: The elimination of chromosomes in the meiotic divisions of *Brachystethus rubromaculatus* DALLAS. Biol. Bull. 90, 19-31 (1946a). — Autosomal elimination and preferential segregation in the harlequin lobe of certain *Discocephalini* (*Hemiptera*). Biol. Bull. 90, 265-290 (1946b). — The role of the kinetochore in the chromosomal evolution of the *Heteroptera* and *Homoptera*. Evolution 1, 134-142 (1947). — SCHRADER, F., and S. HUGHES-SCHRADER: Polyploidy and fragmentation in the chromosomal evolution of various species of *Thyanta* (*Hemiptera*). Chromosoma 7, 469-496 (1956). — WHITE, M. J. D.: The evidence against polyploidy in sexually reproducing animals. Amer. Nat. 80, 610-618 (1946). — WILSON, E. B.: Studies on chromosomes II. J. exp. Zool. 11, 507-545 (1905). — Notes on the chromosome-groups of *Metapodius* and *Banasa*. Biol. Bull. 12, 303-313 (1907).

Prof. Dr. F. SCHRADER, Dr. S. HUGHES-SCHRADER,
Department of Zoology, Columbia University, New York 27, N. Y., USA

From the Department of Botany, Oxford University

THE EFFECT OF HEAT SHOCKS ON CELL DIVISION

By

DOUGLAS DAVIDSON

With 3 Figures in the Text

(Eingegangen am 20. Februar 1958)

I. Introduction

Provided no abnormalities such as chromosome breakage have occurred previously the result of a normal anaphase is the formation of two separate and exactly equal groups of chromosomes. The conditions necessary for a successful division are:

1. The cell must form a bipolar spindle.
2. All chromosomes must possess a centromere; all centromeres must become orientated on the spindle and all must function.

3. The pair of daughter chromosomes at mitosis, or of homologous chromosomes at meiosis, must separate and move to opposite poles. One nucleus should be formed at each of the two poles and all of the chromosomes at a pole should be included in the nucleus.

In the cells of animals and lower plants a centriole and aster occur at each pole of the spindle; they appear to be additional requirements for division. In cells of higher plants seen under the light microscope the centriole and aster are not visible. They are thought to be genuinely absent and not merely beyond the limits of resolution. Though electron microscope studies would be necessary to confirm that they are absent, it is possible to construct models of cell division without them.

Experimental methods of upsetting the actual course of meiotic and mitotic division are numerous. The treatments fall into two groups, chemical, of which colchicine is perhaps the classic example (LEVAN 1938), and physical, for example radiations and temperature shocks. Though these groups include a wide range of causal agents capable of inducing changes, the pattern of cell derangement is often very similar, even in cells in different tissues of unrelated organisms after treatments with different agents. Details of the many aspects of this type of study are given by TISCHLER (1951), WILSON (1925) and HUGHES (1952).

The effects of high temperature shocks on mitosis have been studied (PETO 1935) but in general, attention has been confined to the effects of temperature changes, induced and natural, on cells undergoing meiosis. It is probably because of the fundamental importance of crossing-over that attention has been concentrated on pollen and sperm mother cells.

Continuous high and low temperatures and temperature shocks have been used systematically in studies of the physiological processes of meiosis, particularly in the pollen mother cells of *Oenothera*, which is a structural heterozygote (OEHLKERS 1929, 1936); they have also been shown to affect chromosome pairing and crossing-over (e.g. WHITE 1934; SAX 1937; BARBER 1940; MYERS 1941; SWANSON 1942; PAO and LI 1948; DOWRICK 1956). In these studies treatments were started in pre-meiotic mitosis or at the beginning of prophase. Treatments which are effective toward the end of prophase upset other processes. Chromosome coiling and the terminalization of chiasmata (SWANSON 1942; SNOAD 1954; DOWRICK 1956) may be disturbed; or spindle formation and the normal functioning of the centromere may be affected. It is with the latter phase, which really relates to the actual process of chromosome separation and then cell division, that I have been concerned. In particular, evidence was sought on the interrelationships of the factors necessary for normal division. The literature on temperature effects is extensive and no attempt is made here to review it. Reference will be made only to those studies which appear to be directly relevant to the present experiments.

II. Material and Methods

Cut shoots of *Tradescantia paludosa* and *Tradescantia brevicaulis* were taken from the field. They were kept in jars of distilled water in a light chamber at 21°C for two days. Heat shocks, lasting 1–3 hours were given in a dark chamber at 40°C. Shoots were then returned to the light chamber. Control shoots were kept under identical conditions, only the heat shock was omitted.

Pollen mother cells were prepared as aceto-carmines 5–48 hours after treatment. Preparations were made permanent according to the method of DARLINGTON and LA COUR.

III. Results

1. *Tradescantia paludosa*

In untreated shoots abnormalities appeared always in low frequencies. For example, in 73 pollen mother cells at very early anaphase, only 3 bivalents (0.83%) showed delayed congression. No univalents were found. At a later stage 37 (1.72%) of 2106 tetrads had formed micronuclei. This particular value, 1.72%, was the highest found for abnormal cells of untreated shoots. In treated shoots the frequencies of abnormal cells in affected anthers were always much higher, rising, in some cases to 100%. The number of affected anthers per bud, however, was normally only one or two and it was never greater than three. Effects are also localised in one or two anthers of a bud after treatment of cut shoots with high temperatures (BARBER 1940) and with solutions of chelating agents (DAVIDSON 1958). It appears that sensitivity to these treatments is limited to a particular period in cell development.

a) 3 hour Shock. Cells were examined up to 32 hours after treatment. No anaphase or telophase stages were seen, showing that chromosome separation had been completely suppressed. In cells at metaphase, the bivalents were swollen and highly vacuolated: no univalents were seen. Anthers were later seen to collapse and abort. The treatment, it seemed, had been too drastic. Anaphase was apparently suppressed but there was no evidence to suggest whether the centromeres or the spindle had been inhibited. The length of treatment was reduced for subsequent experiments (cf. *Tradescantia brevicaulis*).

b) 1½ hour Shock. A single series of fixations were made, 6½ hours after the end of the shock. There were never more than two anthers per bud showing affected cells.

Bivalents seen at metaphase appeared to be normal and there had been no failure of pairing. The frequency of chiasmata (Table 1) approximated to that found in untreated cells. Such a result was to be expected after a treatment given only a few hours before metaphase and many hours after chiasma formation.

Table 1. Chiasma frequencies in pollen mother cells of *Tradescantia paludosa* at various times after short heat shocks at 40° C and in untreated cells at 21° C

Duration of shock in hours	Hours after shock	No. of cells	Total No. of chiasmata	Total No. of terminal chiasmata	Average chiasmata/cell	Terminalization Co-efficient
1½	6½	70	985	711	14.07	0.72
1	17	71	977	714	13.7	0.73
1	19	23	296	217	12.8	0.73
Control		73	981	731	13.43	0.74

The first effects of treatment appeared at anaphase. Although the separation of sister-chromosomes occurred, showing that the centromeres and the spindle had functioned, the sister-chromosomes were not directed, as they moved, towards one of two poles. The spindle had functioned, but it had not been a properly constituted, bipolar spindle. As a consequence the chromosomes formed themselves into several nuclei at telophase. In some cells, twelve nuclei were formed; each must have contained a single chromosome (Table 2: Fig. 1). A similar effect was found after a shock of 1 hour. The frequencies of cells with different numbers of nuclei which followed the 1 hour shock will, however, not be given.

The normal functioning of the centromeres and the spindle do not, on their own, result in a normal anaphase. As we have seen, a multinucleate telophase results from the failure of the cell to complete the organization of the spindle into a structure with two poles when it does

Table 2. The frequency distribution of pollen mother cells of *Tradescantia paludosa* with varying numbers of nuclei $6\frac{1}{2}$ hours after $1\frac{1}{2}$ hours at 40°C . Data from 2 anthers

No. of nuclei	2 equal	2 unequal	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total
Anther 1	5	20	16	20	22	19	11	5	—	—	—	—	118
Anther 2	—	—	21	30	39	36	38	34	18	11	1	2	231

not fail to separate the chromosomes. The effects found after a $1\frac{1}{2}$ hour shock thus indicate that the cell mechanism which controls anaphase has several components. They are distinguishable on the basis of their differential sensitivity to applied treatments. And because they can be

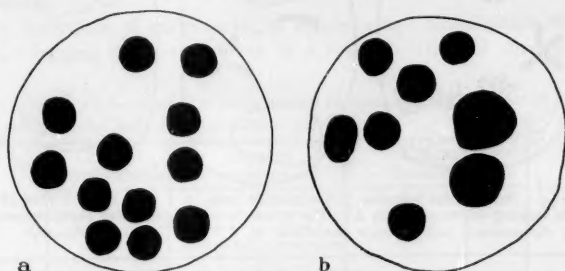


Fig. 1a and b. *Tradescantia paludosa* pollen mother cells. a $1\frac{1}{2}$ hours at 40°C , plus $6\frac{1}{2}$ hours. 12 nuclei, each must be composed of one chromosome. b 1 hour at 40°C plus 19 hours. 8 nuclei of unequal size. $\times 1,600$

inhibited independently of one another, it follows that these components must be capable of acting independently of one another.

c) *1 hour Shock*. Cells were examined 14, 17, 19, and 21 hours after treatment. As in other experiments, usually only 1, or perhaps 2 anthers in each bud contained aberrant cells in frequencies that would have justified scoring. Indeed, all the anthers examined 21 hours after a 1 hour shock had a low frequency of aberrant cells ($< 2\%$) and none were scored. As normal cells were found at all stages from M I to T II it seems that the treatment had been given too long before division to have any effect.

The chiasma frequency in cells fixed 17 and 19 hours after treatment is similar to the frequency in untreated cells (Table 1). This indicates that treatment was given after the period of pairing and formation of chiasmata. It also shows that the shock had not affected the terminalization of chiasmata (cf. SNOAD 1954).

d) *1 hour Shock + 19 hours*. The first abnormal cells found 19 hours after a 1 hour shock were at T I and they contained up to eight instead

of the normal two nuclei (cf. $1\frac{1}{2}$ hour shock). The nuclei were of different sizes (Fig. 1). Only 17 cells in 284 had 2 equal nuclei; and these were the only cells to form cell walls. Chromosome separation appears to have taken place but, as after the $1\frac{1}{2}$ hour shock, the chromosomes did not form two groups at the poles. This may be due in part to chromosomes which lag at anaphase but it would appear that the cells failed to organise compact poles in the spindles. Evidence of lagging chromosomes was found in other buds after the same treatment.

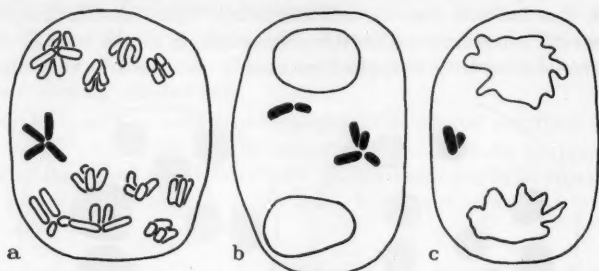


Fig. 2a-c. *Tradescantia paludosa* pollen mother cells. a 1 hour at 40°C plus 19 hours. A single lagging chromosome at AI. The upper pole has only five chromosomes. b A lagging chromosome and a single chromatid at TI. c A lagging chromatid. $\times 1,600$

The cells found at MI 19 hours after a 1 hour shock had a normal chiasma frequency (Table 1) and contained no univalents. However, lagging chromosomes appeared in the same anther in cells which had reached anaphase (Fig. 2). As univalents were absent from metaphase stages, the formation of lagging chromosomes was not due to failure of

Table 3. The distribution of chromosomes of *Tradescantia paludosa* at AI of pollen mother cells 19 hours after 1 hour at 40°C

Anaphase distribution	Normal	6:5 + 1 laggard	7:4 + 1 laggard	7:5	Other distribution	Total cells
No. of cells	24	23	2	15	4	68

pairing. As in *Lolium* (MYERS 1941), the behaviour at anaphase could not have been foreseen at metaphase. In fact, there is no sign of upset until the centromeres begin to separate.

The first visible result of chromosome lagging was unequal segregation. The usual 6:6 segregation of the chromosomes was disturbed (Table 3), and the presence of 1 laggard in a cell meant that the chromosome group at one pole was deficient. Other unusual distributions, for example, 7:5 or 7:4 + 1 laggard, were also found.

At early telophase, when the nuclei have been reorganised at the two poles, the lagging chromosomes were still clearly distinguishable in the cytoplasm. In most cells only a single chromosome lagged, but two affected chromosomes occurred together in some cells (Table 4). Free chromatids were also found. One free chromatid, or three chromatids, indicate that in some cases there had been centromere division, perhaps in a lagging chromosome, and that one of the chromatids had become incorporated into a nucleus at telophase. The treatment appears to have inhibited the centromeres in some respects, upsetting movement to a pole, and to have stimulated them in others, leading to precocious division: all centromeres were not affected however, and in the majority behaviour was normal.

The formation of micronuclei at a later stage of telophase showed that the lagging process was due to a real inhibition of chromosome

Table 4. Frequency distribution of extra nuclear chromosomes and chromatids at early T I in pollen mother cells of *Tradescantia paludosa* 19 hours after 1 hour at 40°C

	Laggard Chromosomes		Laggard Chromosomes		Laggard Chromatids			Total No. of Cells
	1	2	1	2	1	2	3	
			plus 1 chromatid	plus 1 chromatid				
No. of cells	217	37	4	2	2	21	1	284

movement. Cells with a single micronucleus were more frequent than those with two micronuclei. This result might have been predicted (Table 4).

Centromere misdivision in lagging chromosomes or chromatids was never found. It could not occur if, as has been suggested, the causal origin of the lagging chromosome lay in centromere inhibition. Contrast this with the behaviour in other plants; centromere misdivision occurs in lagging chromosomes and the telocentrics formed function on the spindle and pass to the poles (DARLINGTON 1936; 1940 a and b).

e) 1 hour Shock + 17 or 14 hours. When the interval between treatment and fixation was reduced from 19 to 17 or 14 hours, metaphase continued to appear normal (Table 1) and the frequency of cells showing errors at A I and T I fell to 3% or less. The frequency of cells showing errors at T II increased however. After 17 hours 23% of the 134 tetrads examined had micronuclei and after 14 hours 43% of 199 tetrads had micronuclei or free chromatids. In so far as first division of meiosis can be affected, the cells cease being sensitive to a shock of 1 hour slightly less than 19 hours before anaphase. But this does not hold for second division. It appears that there the sensitive period in which spindle-

centromere activity can be upset, occurs closer to the time of division i.e. about 14 hours or less before anaphase. Abnormalities at first division may still be induced a few hours before anaphase however if the shock period at 40°C is increased to 1½ hours (see above).

2. *Tradescantia brevicaulis*

The frequency of aberrant cells in untreated material was determined at T I and T II. Less than 2% of cells showed free chromosomes or micronuclei. These frequencies are similar to those found in *Tradescantia paludosa*. Chiasma frequencies were not scored in either untreated

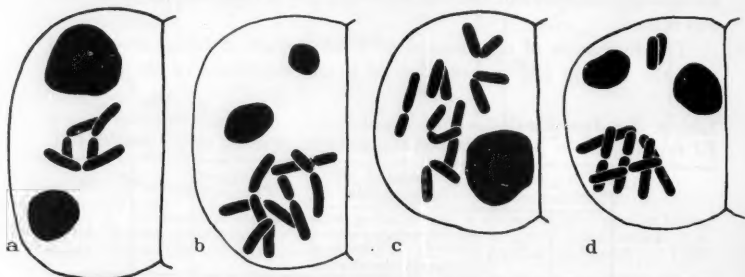


Fig. 3a—d. *Tradescantia brevicaulis* pollen mother cells showing one of the two cells of the dyad. 3 hours at 40°C plus 5 hours. a Three free chromosomes at T II. b Two unequal nuclei and six chromosomes at T II. c One nucleus and seven chromosomes at T II. d Two nuclei and seven chromosomes at T II. $\times 1,600$

or treated materials. Metaphases appeared normal and no univalents were seen. Fewer experiments were made than with *Tradescantia paludosa* but the results showed that the two species differed in their response to a heat shock.

a) 3 hour Shock. All cells at M I appeared to be normal and normal cells at A I—T I and T II were also found 5 hours after the end of the temperature shock. Only 8% of 302 cells seen at A I—T I had visible upsets; lagging chromosomes or chromatids, or micronuclei were present. At T II the frequency was higher; 26.4% out of 1123 cells scored were abnormal. In many cells, effects were seen only in one cell of the pair that make up the pollen mother cell after T I and wall formation. The effects resembled those in *T. paludosa*. There were lagging chromosomes and chromatids, and cells with unequal distributions of chromatids (Table 5, Fig. 3); cells with two groups of chromatids instead of one at a pole; cells with micronuclei or two unequal nuclei, and some with a single, elongate nucleus, the result of faulty separation. The number of dyads with two groups of chromatids at one pole was small (16). The

Table 5. The distribution of chromosomes and chromatids in dyads of pollen mother cells of *Tradescantia brevicaulis* at AII 5 hours after 3 hours at 40°C

	Dyads with unequal chromatid segregations				Dyad with lagging chromosomes			Total No. Cells
	7:5	8:4	9:3	10:2	No. of Chromosomes			
					1	2	3	
No. of cells	13	8	6	1	26	6	2	63

data for these cells therefore, also that of the frequency of cells with micronuclei, will not be given.

Micronuclei were also found in tetrads 28 hours after a 3 hour shock, but the number of affected tetrads was lower than 5 hours after a heat shock. Many tetrads however had pynotic or highly vacuolated nuclei and the cells soon died. The anthers themselves were later seen to abort.

b) 1 hour Shock. Cells were fixed 7 and 31 hours after a 1 hour shock. The frequencies of abnormal cells were low in all fixations. Never more than 5.4% (of up to 1,000 cells) showed effects at MI—TII 7 hours after the temperature shock, and 3 hours after the shock the highest frequency of affected cells was 4.6%. The effects were similar to those already described for *T. brevicaulis* after a 3 hour temperature shock.

3. *T. paludosa* and *T. brevicaulis*

Many of the effects seen after heat shocks were the same in both species. *T. paludosa* was more sensitive to a 3 hour shock, which stopped all division, than *T. brevicaulis*. It also showed one effect, a multinucleate condition at TI, which was not found in *T. brevicaulis*. In general, effects in *T. paludosa* tended to be most frequent at AI—TI, in *T. brevicaulis* they were frequent at AII—TII.

The two species were alike in effects which can be attributed to irregularities of centromere behaviour or activity and they differ in effects involving the spindle mechanism; these occurred in *T. paludosa* but very infrequently in *T. brevicaulis*. The differences in sensitivity and in the type of abnormality found in these species are indications of interesting physiological differences that may have important consequences for the survival and reproduction of plants under field conditions of high temperatures.

IV. Discussion

The exposure of organisms to temperatures outside the range to which they are normally accustomed can lead to cell damage or to death. As with other types of physical or chemical treatment that induce cell damage, the initial site of action cannot be pinpointed exactly, though the site of damage is clear.

Proteins are important cell constituents. They are denatured and thus inactivated by high temperatures. The denaturation of proteins would interfere severely with spindle formation since the spindle is composed, at least in part, of proteins (MAZIA 1957); and it would also affect enzyme action. A short high temperature shock, like a long continuous exposure, would result in enzyme inactivation. It would be particularly effective on those enzymes whose period of activity coincided with the time of the temperature shock. The mechanism of the apparent effects on centromeres may lie in enzyme inactivation, for there is evidence that enzymes involved in the movement of the chromosomes at anaphase originate at the centromere (RHOADES and KERR 1949). A limited inactivation of enzymes might also be the basis of the differential response of the cells after short heat shocks.

In addition to the effects on proteins, temperature changes may also affect the spindle by affecting sol-gel transformations. Gelation is thought to be an important part of the preparations for spindle formation (HEILBRUNN 1952).

Spindle and centromere abnormalities have been found together in *Tradescantia* plants after other treatments. Lagging chromosomes, micronuclei, unequal segregations at AI and unequal nuclei at TI were found after exposures to low oxygen pressures (STEINITZ 1949) and in plants grown in sulphur-deficient media (STEFFENSEN 1954). They also occur in *Rhoeo* after heat shocks (HASELWARTER 1937).

a) *The Centromere.* Abnormal behaviour of one or of a few chromosomes of a cell was seen. During first division, the chromosomes lag at anaphase and fail to reach the poles; they finally form micronuclei. Alternatively, they separate into chromatids at first instead of at second division and the chromatids lag at anaphase. Lagging at anaphase was also seen during second division. These effects, it is suggested, are due to upsets in the functioning or in the division cycle of the centromere. Centromere upset may also be responsible for the occasional unequal segregation of chromosomes at AI.

Precocious division of the centromeres also followed a heat shock in *Trillium*. In addition, it was found that there were unequal segregations at anaphase. As all the centromeres had divided, the cells contained chromatids and not chromosomes (MATSUURA 1937); their segregation indicates however that there had been no inactivation of the centromere, or of the spindle. Centromere division, and even misdivision at AI has also been found in univalents and in lagging chromosomes (DARLINGTON 1939). These two types of chromosomes have very different origins. Univalents are formed because of a failure of pairing and chiasma formation. Laggards, unlike univalents, are not visible before metaphase. They may be formed from bivalents which are late or find difficulty in

congressing on to the metaphase plate (DARLINGTON 1936), or from trivalents (DARLINGTON 1940a).

Trivalents did not occur in the diploid *Tradescantia* species used here, therefore lagging chromosomes cannot have arisen from the failure of co-orientation. Neither were they derived from bivalents which did not congress on to the metaphase plate, nor from univalents. There was no indication at metaphase that laggards would appear. Only at anaphase, when centromere movement should have occurred, were the lagging chromosomes found. On this evidence it would seem that, as in *Lolium* (MYERS 1941), their formation can only be due to the inactivation of their centromeres.

b) *The Spindle*. Effects attributed to abnormal spindles are of two main types. In one, anaphase movement of the chromosomes or chromatids occurs but the spindle is multipolar and not bipolar and several nuclei are formed; in the other, anaphase does not occur and a single restitution nucleus is formed by the chromosomes. But a single restitution nucleus would also be formed if all centromeres in a cell were inactivated. Thus it has not always been possible to distinguish between the two causes with certainty. Some effects therefore may have been wrongly labelled as spindle errors when they may also have involved centromere upsets (e.g. the effects found in *T. paludosa* after a 3 hour shock).

The eventual result of a heat shock, usually cell death and anther abortion, prevented the study of later behaviour in cells with a restitution nucleus or with several nuclei. In *Gasteria*, cells with restitution nuclei formed after temperature treatments survive and produce polyploid gametes (STRAUB 1939). The death of one inflorescence is relatively unimportant in a plant with a long flowering period. It is only when effects are induced in important centres of cell division i.e. apical meristems, that they may effect the plant's chances either of survival or of producing viable offspring. If abnormalities are confined to the germ cells and somatic divisions remain normal the plant can be successful as an individual, if not as a parent. Abnormal meiotic divisions, attributed to genetic causes, occur in *Festuca-Lolium* derivatives (DARLINGTON and THOMAS 1937) and in *Zea* (CLARK 1940). The spindle fibres diverge at the poles and multinucleate pollen mother cells are formed; somatic cells behave normally however.

In some animals in the cells undergoing meiosis the spindles lack two localized poles (SCHRADER 1953). Similar behaviour occurs in *old* roots of *Drosera* (ROSENBERG, see TISCHLER 1951, p. 143 fig. 52) but in somatic divisions in flowers and in pollen mother cells of *Drosera* bipolar spindles with localized poles do occur (LEVINE 1916). Whether the spindle poles are localized or diffuse only two nuclei are formed at the end of division.

This result is achieved, even with diffuse poles because the cells have maintained control over the course of division: they maintain a strict polarity that is absent from those cells which become multinucleate.

The failure of cells, especially after experimental treatments, to maintain their polarity has most marked results in plant apical meristems. In each cell in a normal meristem, spindle formation, cell wall formation and cell elongation each occur along a strictly defined axis. Colchicine (LEVAN 1938) and ethyl alcohol (BARTHELMLESS 1957) can prevent cell division; and I find that phenyl mercuric acetate, a sulphhydryl inhibitor, has a similar effect. When the spindle is upset, but division is not altogether prevented, i.e. after treatment with very weak solutions of these compounds, multinucleate cells are formed. Then elongation no longer takes place only along the longitudinal axis of the root. Cells swell along the transverse as well as the longitudinal axes of the root and so give rise to the typical C-mitotic tumour; an upset of the polarity of the cell is followed by an upset in the polarity of the whole root.

Chemical treatments, like heat shocks, reveal that the mechanism which carries through a successful anaphase is composed of several distinct components. Separation of chromosomes or chromatids for example occurs even though the spindle has more than two poles. A differential sensitivity of the factors responsible for anaphase has also been found in animal cells. It has been possible by treatment with chloral hydrate (RIS 1949) to separate chromosome movement due to fibre contraction from that due to spindle elongation as the latter process is differentially inhibited. As in plant cells, the various processes of anaphase can be distinguished on the basis of their different sensitivities to treatments.

Summary

1. Cut shoots of *Tradescantia paludosa* and *Tradescantia brevicaulis* were given heat shocks at 40°C for 1–3 hours. Chromosome pairing and chiasma formation were not affected.

2. In both species, spontaneous abnormalities seen at various stages from MI–TII never affected more than 2% of cells.

3. Induced errors appeared in up to 100% of cells in affected anthers, but never more than three of the six anthers per bud were affected. The errors did not include increased terminalization of chiasmata nor premature desynapsis of bivalents.

4. In *T. paludosa* a 3 hour shock suppressed anaphase completely and a 1½ hour shock induced micronucleate cells. Chromosome separation was not prevented but the spindle does not appear to have been bipolar.

5. Multinucleate cells also appeared in *T. paludosa* after a 1 hour shock. Most of the effects however were attributable to centromere disturbances. They were:

- a) at AI: lagging chromosomes, abnormal chromosome segregations, precocious centromere division resulting in free chromatids.
- b) at TI: micronuclei resulting from lagging chromosomes.
- c) at TII: micronuclei.

Effects induced by a 1 hour shock are most frequent at AI and TI after 19 hours and at TII after 17 or 14 hours.

6. *T. paludosa* is more sensitive than *T. brevicaulis* to high temperature shocks.

7. Upsets can be attributed to:

- a) Spindle inhibition.
- b) Failure of the cell to organise a function spindle into a bipolar structure.
- c) Centromere inactivation.

The various components of anaphase can be distinguished on the basis of their differential sensitivity to heat shocks.

I am grateful to Professor C. D. DARLINGTON for much helpful criticism; also the Agricultural Research Council for the award of a Scholarship.

References

- BARBER, H. N.: The suppression of meiosis and the origin of diplochromosomes. *Proc. roy. Soc. B* **128**, 170—185 (1940). — BARTHELMESS, A.: Chemisch induzierte multipolare Mitosen. *Protoplasma* (Wien) **48**, 546—561 (1957). — CLARK, F. J.: Cytogenetic studies of divergent meiotic spindle formation in *Zea mays*. *Amer. J. Bot.* **27**, 547—559 (1940). — DARLINGTON, C. D.: The external mechanics of the chromosomes. *Proc. roy. Soc. B* **121**, 264—319 (1936). — Misdivision and the genetics of the centromere. *J. Genet.* **38**, 341—364 (1939). — The origin of isochromosomes. *J. Genet.* **39**, 351—361 (1940a). — The prime variables of meiosis. *Biol. Rev.* **15**, 307—322 (1940b). — DARLINGTON, C. D., and P. T. THOMAS: The breakdown of cell division in a *Festuca-Lolium* derivative. *Ann. Bot. (Lond.)*, N.S. **1**, 747—762 (1937). — DAVIDSON, D.: The effects of chelating agents on cell division. *Exp. Cell Res.* **14**, 329—332 (1958). — DOWRICK, G. J.: The influence of temperature on meiosis. *Heredity* **11**, 37—49 (1957). — EMSWELLER, S. L., and P. BRIERLEY: The effects of high temperature on metaphase pairing in *Lilium longiflorum*. *Bot. Gaz.* **105**, 49—57 (1943). — HASELWARTER, A.: Untersuchungen zur Physiologie der Meiosis. *V. Z. Bot.* **31**, 273—328 (1937). — HEILBRUNN, L. V.: An outline of general physiology, 3. edit. Philadelphia: W. B. Saunders Company 1952. — HUGHES, A.: The mitotic cycle. London: Butterworth & Co. 1952. — LEVAN, A.: The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Hereditas* (Lund) **24**, 470—486 (1938). — LEVINE, M.: Somatic and reduction division in *Drosera*. *Mem. N. Y. Bot. Garden* **6**, 125—147 (1916). — MATSUURA, H.: Chromosome studies on *Trillium kamtschaticum* PALL. V. Abnormal meiotic divisions due to high temperature. *Cytologia* (Tokyo) Fujii Jubilee-Vol. **1**, 20—34. — MAZIA, D.: Some problems in the chemistry of mitosis. In: The chemical basis of heredity, edit. W. D. McELROY and B. GLASS. Baltimore: Johns Hopkins University Press. 1957. — MYERS, W. M.: Variations in chromosomal behaviour during meiosis among plants

of *Lolium perenne*. Cytologia (Tokyo), 11, 388—406 (1941). — OEHLKERS, F.: Untersuchungen zur Physiologie der Meiosis. I. Z. Bot. 29, 1—53 (1929). — III. Z. Bot. 30, 253—276 (1936). — PAO, W. K., and H. W. LI: Desynapsis and other abnormalities induced by high temperature. J. Genet. 48, 297—310 (1948). — PETO, F. H.: Associations of somatic chromosomes induced by heat and chloral hydrate treatments. Can. J. Res., C 13, 301—314 (1935). — RHOADES, M. M., and W. E. KERR: A note on centromere organisation. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 35, 129—132 (1949). — RIS, H.: The anaphase movement of chromosomes in the spermatocytes of the grasshopper. Biol. Bull. 96, 90—106 (1949). — SAX, K.: Effect of variations in temperature on nuclear and cell division in *Tradescantia*. Amer. J. Bot. 24, 218—225 (1937). — SCHRADER, F.: Mitosis. 2. edit. New York: Columbia University Press, 1953. — SNOAD, B.: Ann. Rep. John Innes Hort. Inst. (Bayfordbury) 45, 19—20 (1954). — STEFFENSEN, D.: Irregularities in chromosome division in *Tradescantia* grown on low sulphate. Exp. Cell Res. 6, 554—556 (1954). — STEINITZ, L. M.: The effect of lack of oxygen on meiosis in *Tradescantia*. Amer. J. Bot. 31, 428—443 (1944). — STRAUB, J.: Polyploidieauslösung durch Temperaturwirkungen. Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an der reproduktiven Phase von *Gasteria*. Z. Bot. 34, 385—481 (1939). — SWANSON, C. P.: Meiotic coiling in *Tradescantia*. Bot. Gaz. 103, 457—474 (1942). — TISCHLER, G.: Handbuch der Pflanzenanatomie. Bd. II: Allgemeine Pflanzenkaryologie. Kernteilung und Kernverschmelzung. 2. Aufl. Berlin. 1951. — WILSON, E. J.: The cell in development and heredity. 3. edit. New York: Macmillan 1925. — WHITE, M. J. D.: The influence of temperature on chiasma frequency. J. Genet. 29, 203—215 (1934).

Dr. D. DAVIDSON,

Department of Botany, South Parks Road, Oxford, England

From the Department of Botany, University of Wisconsin, Madison

REDUCTIONAL GROUPINGS IN COLD-TREATED ONION ROOTS*

By

D. SRINIVASACHAR and K. PATAU

(Eingegangen am 16. Mai 1958)

I. Introduction

Reductional groupings (R. G's) have been defined as "a nuclear condition showing otherwise normal mitotic chromosomes separated into two (or more) numerically equal or unequal groups" (PATAU 1949). The term "reductional" merely expresses the fact that each group has a reduced number of chromosomes, their sum total being equal to the somatic number. To what extent prophase R. G's continue into metaphase is still an open question. At present it appears likely that at least the majority of metaphase R. G's arise *de novo* due to disturbances in spindle formation such as described by DARLINGTON and THOMAS (1937). If the two groups stay separate in at least one daughter plate throughout anaphase and telophase¹, at least on this side two reduced nuclei will be formed. These are likely to be included in one cell (cf. DARLINGTON and THOMAS 1937, text fig. 12) which may be termed "diploid binucleate". However, if the spindle, or spindles, should be more or less parallel to the line determined by the centres of the two groups, ordinary cell wall formation could isolate reduced nuclei in cells of their own. In the same manner reduced cells could also be derived from a diploid binucleate cell undergoing another mitosis. This process already has been described by SAKAMURA (1916) and is well illustrated by his plate Fig. 10, even though this depicts what we now would call a tetraploid binucleate cell in mitosis. The possibility of a R. G. leading, directly or by way of a binucleate cell, to a cell with one reduced nucleus cannot be denied.

Scoring of R. G's is highly subjective, as chromosome arrangements occur which range continuously from the merest indication of groups

* Contribution from the Programme in Cytology, Department of Botany, University of Wisconsin, Madison, supported by grants to late Dr. C. LEONARD HUSKINS from the American Cancer Society upon recommendation of the Committee on Growth of the National Research Council, from the Rockefeller Foundation and from the Research Committee of the Graduate School with funds supplied by the Wisconsin Alumni Research Foundation.

¹ R. G's at late anaphase and telophase imply, of course, a multipolar condition of the spindle.

to well separated ones. The number of R. G's scored in a sample increases greatly if the standard of separation is lowered. This is to be expected if the formation of groups should be largely a random process¹. Since the choice of the standard of separation is arbitrary, the frequency of R. G's has little meaning unless frequencies from different samples are to be compared that have been scored by the same standard. Because of the difficulty of maintaining a consistent standard such comparisons are highly sensitive to unconscious bias and to shifts of standard in time. Systematic errors from these sources can be eliminated by scoring from coded slides arranged in several runs each of which contains slides, in a random sequence, from all samples to be compared. HUSKINS and CHENG (1950), using such coded slides, observed an increase in the frequency of R. G's in onion roots after treatment with low temperature (for a detailed description of the experiment cf. CHENG 1950). Compared with the average frequency of R. G's in roots grown at room temperature and fixed at the beginning of the experiment, that in roots kept in cold was significantly higher after 5, 12, and 19 days, had dropped to about the original level after 26 and 32 days and was found to be higher again after 40, 48, 55 and 64 days (significantly higher in three out of these last four samples). One bulb was transferred into room temperature after 40 days. Hundred and twenty hours later the average frequency of R. G's in roots from this bulb had gone back to the level obtained at the beginning of the experiment.

In view of the lack of parallel controls and of the fluctuations in the frequency of R. G's in roots which stayed in cold temperature the data do not entirely exclude the possibility that the frequency changes were caused by factors other than cold, in other words, that the low frequency level found twice at room temperature was a mere coincidence. This alternative may not appear as very likely but the probability of such a coincidence is not low enough to establish statistical significance. The present study was planned with the expectation of confirming the induction of R. G's by low temperature. In order to make an experiment of limited scope give definite results it appeared best to use only one duration of cold treatment. Judged by HUSKINS and CHENG's data, ten days promised to produce a high yield of R. G's. The experiment was undertaken and its negative results are being published in accordance with late Dr. HUSKINS' wish.

¹ Randomness of R. G's is apparently contradicted by unequivocal evidence of an above random degree of homologous segregation of chromosomes in well separated groups (PATAU 1949, supporting earlier conclusions by WILSON and CHENG 1949). However, most of these cells may already have been binucleate. It is conceivable that they underwent mitosis more readily because they happened to have a more nearly balanced chromosome complement in each nucleus.

II. Material and Methods

HUSKINS and CHENG's data (CHENG 1950) indicated a larger variation between roots from different bulbs than between those from the same bulb. Since only roots from different bulbs can receive different temperature treatment, statistical tests must be based on the inter-bulb variation. For this reason only one root per bulb was analysed, and this only partially. PATAU and PATIL (1951) have pointed out that in view of the considerable variation between roots it amounts to a waste of effort to count all mitoses in a root as large as that of onion. It is more important to increase the number of roots, rather than to decrease the sampling error per root beyond a certain point. In order to obtain an unbiased subsample of meristematic cells a microtome with rapidly vibrating knife (designed by PERSIDSKY 1953) was employed to cut a median longitudinal section of 150 μ thickness from the living root. Living roots were used because it appeared that in that case the cell content is always washed out if the knife has penetrated a cell deep enough to cut the nucleus as no sectioned nuclei were found. The root sections were fixed in acetic alcohol 1:3, Feulgen stained, and squashed and mounted in the usual manner. Over-squashing was avoided as far as possible.

A commercial variety of onion, different from that used by HUSKINS and CHENG (1950) was chosen for the thickness of the roots which facilitated sectioning. Sixty bulbs were placed on individual vials containing tap water and kept in darkness at room temperature (21–22°C) for four days. Only 51 bulbs had developed roots, and were separated at random into three groups of 17 bulbs each. One group was left at room temperature to serve as a parallel control. One was transferred into the dark room, maintained at a temperature of 5–6°C, which had been used by HUSKINS and CHENG for their cold treatment. From the third group slides were prepared immediately. After ten more days slides were made from the cold-treated group and from the 2nd control group. From each bulb the longest root was selected, or, the next longest, if the sectioning of the former failed. Roots from both groups were sectioned in an alternating sequence in order to ensure that a conceivable change in thickness of the sections would affect both groups equally. The lowest number of mitoses found in any of the 51 slides was 104.

These slides were coded in the following way. In each of the three groups one slide was selected at random. These slides received, again at random, the code numbers 1, 2, 3. By the same random procedure the next three code numbers were distributed. Similarly all the other slides were given code numbers. Thus the scoring, by the first author, was done in ignorance of the treatment a root had received, while the mixed sequence ensured that a conceivable unconscious shift in standard would not introduce a systematic error.

III. Results

The subjectivity of scoring R.G's has been stressed above. The present standard of scoring was similar to that used by HUSKINS and CHENG but can hardly be quite the same. The absolute percentages obtained by them and by the present authors should, consequently, not be compared. What can be compared are frequency changes. The chromosome number could not always be determined but there is no reason to doubt that at least in the great majority of R.G's the number per group (varying from 2 to 14 in the present data) added up to

the diploid number 16. Some R.G's were scored which could be considered as having three instead of the usual two groups.

Table 1 shows that ten days of cold treatment does not generally increase the frequency of R.G's relative to that in parallel controls. The over-all percentage of R.G's of all stages which was used by HUSKINS and CHENG is in the present experiment actually smaller (0.5%) in cold treated than in roots of the 2nd control (0.7%), and both values are considerably smaller than that obtained in the 1st control (1.5%). However, in the present data the over-all percentage is not very meaningful, as the frequencies of R.G's differ from stage to stage. Frequency differences as such between stages are none too meaningful either. Strictly speaking, there is no common standard of scoring R.G's at different stages. Also, any exaggerating or obscuring effect of the squashing on the appearance of R.G's would be likely to be different for different stages. For these reasons it would, for instance, be rash to regard the apparent increase in the frequency of R.G's from metaphase to anaphase in both controls (table 1) as proving new R.G's to arise at anaphase.

Table 1

Group ¹	Time	Temperature °C	No. of Mitoses		Frequency of R.G's at					
			normal	R.G's	Prophase early to mid. (%)	Prophase late (%)	Metaphase (%)	Anaphase (%)	Telophase (%)	
1st control	At start of treatment	21—22	9785	148	0.04	1.99	6.19	7.19	—	
2nd control cold treated	after 10 days	21—22	6200	43	—	—	2.65	3.41	—	
		5—6	14865	71	0.22	2.12	2.24	1.66	0.03	
Total			30850	262						

¹ Each consisting of 17 samples, each from the longest root of another bulb.

There is no doubt that squashing does affect the appearance of R.G's, and that over-squashing may occasionally cause the chromosomes of a normal mitosis to separate into groups. It must, however, be stressed that the majority at least of metaphase and, presumably, anaphase R.G's are real. They are also found in sections. Extensive experiments with roots of *Rhoeo* (MARTINEZ-PICO¹, 1951; OWCZARZAK¹, 1953) and *Tradescantia* (HERSHCOFF¹, 1951) have established that sodium nucleate treatment increases the frequency at least of metaphase R.G's in sections and in squash preparations in essentially the same manner, although the absolute values of the frequencies differ because of the

¹ Working with the second author.

impossibility of matching the standards of scoring. It seems that the rigidity of the spindle apparatus preserves, rather well, the pattern of their arrangement during the spreading of chromosomes by squashing. Prophase R. G's also occur in sections but a certain fraction of those scored in squash preparations may possibly be artificial. Prophase R. G's presuppose, of course, a nuclear volume which is large enough relative to that of the chromosomes to make group formation possible. This definitely is the case in many late prophase nuclei of *Rhoeo*, and apparently also of onion, but hardly in early prophase nuclei. Hence, it is not surprising that an appreciable frequency of prophase R. G's is found only in fairly late prophase nuclei (table 1).

Prophase is the only stage which yielded more R. G's in the cold treated roots than in those of the 2nd control. The difference seems to be significant in late prophase nuclei (table 2) and indicates that not

Table 2

Group	Early to mid-prophase		Late prophase		
	normal	R. G.	normal	R. G.	total
2nd control	2413	—	161	—	161
cold treated	6210	14	555	12	567
total			716	12	728

$$P = 0.049^*.$$

* Probability of obtaining, by chance and with the given marginal totals, the observed discrepancy (computed according to FISHER 1934, p. 99—101).

all of the prophase R. G's were artefacts. The difference would also be statistically significant in early to mid-prophase nuclei if these figures (table 2) could be taken as homogeneous samples. This, however, was not possible. In view of the relatively high number of late prophase nuclei in the cold-treated roots the percentage of "early to mid-prophases" which were advanced enough for becoming R. G's may have been considerably larger in the treated than in the 2nd control group.

The decrease in the frequencies of metaphase and of anaphase R. G's during the ten days is statistically significant both in cold treated roots and in those kept at room temperature. It will be sufficient to demonstrate this for the least obvious case, the decrease from the 1st to the 2nd control. Using square roots of the percentages per root sample, $t_{32} = 2.63$ is obtained for metaphase R. G's and $t_{32} = 2.64$ for anaphase R. G's both corresponding to $P = 0.013$. The present experiment agrees with that of HUSKINS and CHENG in showing that considerable variation in the frequencies of metaphase and anaphase R. G's occurs in roots which are kept at an approximately constant temperature. The causes

of this variation are unknown. The fact that during comparable periods of the two studies frequency changes of the same magnitude took place that had opposite direction does not establish a real contradiction. The two experiments were not equal in every respect. This would not have mattered, if the frequencies of metaphase and anaphase R. G's were always larger in roots kept at 5–6°C than in roots at 21–22°C. This is not the case. Our cold treated roots seem to have a lower, certainly no higher, incidence of metaphase and anaphase R. G's than the roots of the 2nd control which had remained at room temperature. In HUSKINS and CHENG's experiment which did not permit a similar comparison between simultaneously fixed samples cold may or may not have increased the frequency of metaphase and anaphase R. G's. In any case the R. G. inducing effect, if any, of a temperature of 5–6°C cannot be compared with that of sodium nucleate which has increased the frequency of R. G's in all experiments employing a sufficient concentration of that substance (see p. 232).

In a total of 11277 telophases only two R. G's, i. e. 0.02%, were found which compares with an over-all frequency of 4.5% of what has been scored here as anaphase R. G's. Doubtless the two telophase R. G's had derived from anaphase R. G's in which at least near one pole the groups had remained sufficiently apart to form separate nuclei. It appears possible that such R. G's with a particularly high degree of separation are often binucleate cells in mitosis rather than newly arisen, "primary" R. G's. In stages later than prophase, primary R. G's and binucleate mitoses cannot be distinguished, and even in prophase it will often be impossible to decide whether two squashed groups of chromosomes are included in one nucleus or in two closely adjoining nuclei. In the present data only one binucleate prophase was recognized but there may have been more. The majority of prophase R. G's must have been primary as otherwise they should have been found with an appreciable frequency also at early prophase.

In both telophase R. G's at least one diploid binucleate cell was obviously being formed but the two nuclei in each case seem to differ in chromosome number. The probability of a mitosis producing, by means of R. G., a binucleate cell with the haploid number eight in each nucleus was probably considerably smaller than 0.0002. The probability of these eight chromosomes representing a balanced genome must be much smaller still, for neither WILSON and CHENG (1949) nor PATAU (1949) found anything near regular segregation of homologous chromosomes. The above-random degree of segregation they did find may have been secondary, namely due to selection amongst binucleate cells (see foot note p. 230). If R. G's were the product of essentially random processes the probability of 8:8 groupings presumably would have

approximately (though almost certainly not precisely) the binomial value 0.20. The probability of an 8:8 grouping having complete segregation of homologous chromosomes would be 0.02. Consequently, the probability of obtaining a telophase R. G. that leads to binucleate cell with one complete genome in each nucleus would be $0.0002 \times 0.2 \times 0.02 = 10^{-6}$. The question of randomness is methodologically very involved. We do not think that there is any undisputable evidence of non-randomness in primary R. G's. But even if there should be some degree of non-randomness, this could hardly amount to more than an increase of the last-stated probability by a factor 10, or so, which would bring it up to about 10^{-5} . On the other hand, even 10^{-6} may have been an overestimate, as the computation was based on the interpretation which is open to question that the two telophase R. G's were primary ones.

It appears unlikely that the binucleate state would always be maintained¹ during subsequent mitoses until at least one reduced cell has been given off. That this may be a rather exceptional event is indicated by the fact that in the present experiment not a single reduced cell was found in contrast to three diploid binucleate cells (including the ones being formed by the two telophase R. G's). All of the 31112 mitotic cells scored suggested a chromosome number that was at least approximately diploid. In other slides of onion roots, however, one case of two late prophase nuclei, obviously sister nuclei, with seven chromosomes each was found (SRINIVASACHAR 1958).

IV. Discussion

Somatic reduction may be considered as a kind of genome mutation. In onion its rate is comparable with rates of gene mutations. Somatic reduction which achieves perfect segregation of homologous chromosomes may have a rate that is small even on the scale of gene mutation rates. This being so it will be next to impossible to demonstrate directly the occurrence of any particular mechanism of somatic reduction. It seems highly likely that one such mechanism, not necessarily the only one, starts from R. G's. These appear as a kind of irregularity in mitoses in which the spindle, even if somewhat disorganized, still functions so that sister chromatids move towards opposite poles. A very different situation prevails in a full c-mitosis. Here the chromosomes are left free in the plasma and may, if there is sufficient space available, form all sorts of random groups under the influence of plasma currents. Such groups have been described frequently. Due to the fact that in c-mitosis sister chromatids usually stay together restitution nuclei

¹ Fusion of the nuclei in a binucleate cell during mitosis has been observed in vivo by FELL and HUGHES (1949) in mouse tissue culture.

formed from such groups cannot ordinarily obtain a single complete genome. But they are bound to obtain occasionally by chance a diploid chromosome set which automatically would be perfectly homozygous. Thus c-mitoses can cause segregation without reduction (cf. WILSON, HAWTHORNE and TSOU, 1951). This seems to have happened in FRANZKE and ROSS' (1952) experiments with *Sorghum*.

The rather high incidence of somatically reduced cells which has been found in certain tetraploid plants (e. g. *Ribes*: VAARAMA 1949; *Rhoeo*: HUSKINS and CHOUINARD 1949) is not yet fully understood. R. G's were probably involved. It is conceivable that in these cases a special genetical situation existed, such as the presence of a sublethal gene which could be eliminated by somatic reduction. Thus the observed frequency of reduced cells may in part have been the result of intercellular selection by means of a superior division rate of certain types of reduced cells. A greatly increased rate of the process of somatic reduction is, of course, also conceivable. SACHS (1952) has interpreted the chromosome mosaics he found in anthers of amphidiploids of *Triticinae* as arising "by gene-controlled spindle abnormalities (presumably R. G's in our terminology) just before meiosis". Up to now nothing has been established in plants that could be compared with the regular process of somatic reduction which has been reported by BERGER (1938) for *Culex*. We have not observed any clear case of pairing nor any sign of chiasmata and we agree with WILSON, HAWTHORNE and TSOU (1951) and with SACHS (1952) that somatic reduction, as it occurs in onion, does not show any relation to meiotic processes.

Summary

In roots which had been kept for ten days at 5–6°C the observed frequency of metaphase and anaphase reductional groupings (R. G's) was lower, that of prophase R. G's higher, than in simultaneously fixed roots kept at 21–22°C. The frequency of R. G's can undergo considerable changes independent of temperature.

It appears highly likely that a process of somatic reduction may start from R. G's but its successful conclusion would be, at least in onion, a very rare event. In the present material the probability of a mitosis becoming a R. G. that finally leads to a haploid cell with a complete genome is almost certainly less than 10^{-5} and more likely less than 10^{-6} .

Literature cited

- BERGER, C. A.: Multiplication and reduction of somatic chromosome groups as a regular developmental process in the mosquito, *Culex pipiens*. Carnegie Inst. Wash. Publ. 496, 209–232 (1938). — CHENG, K. C.: A quantitative analysis of a type of reductional mitosis induced in *Allium cepa* by low temperatures. Ph. D. Thesis, Univ. of Wisconsin 1950. — DARLINGTON, C. D., and P. T. THOMAS: The

breakdown of cell division in a *Festuca-Lolium* derivative. Ann. Botany, N. S. 1, 747—761 (1937). — FELL, H. B., and A. F. HUGHES: Mitosis in the mouse: A study of living and fixed cells in tissue cultures. Quart. J. micr. Sci. 90, 355—380 (1949). — FISHER, R. A.: Statistical methods for research workers, 5th ed. Edinburgh, London 1934. — FRANZKE, C. J., and J. G. ROSS: Colchicine induced variants in *Sorghum*. J. Hered. 43, 106—115 (1952). — HERSHCOFF, M. W.: Reductional groupings and other mitotic effects of sodium nucleate in root tips of *Tradescantia paludosa*. Ph. D. Thesis, Univ. of Wisconsin 1951. — HUSKINS, C. L., and K. C. CHENG: Segregation and reduction in somatic tissues. IV. Reductional groupings induced in *Allium cepa* by low temperature. J. Hered. 41, 13—18 (1950). — HUSKINS, C. L., and L. CHOUINARD: Somatic reduction: diploid and triploid roots and a diploid shoot from a tetraploid *Rhoeo*. Rec. Gen. Soc. Amer. 18, 95 (1949), Genetics 35, 115 (1950). — MARTINEZ-PICO, M.: Reductional groupings in *Rhoeo discolor* induced by sodium nucleate. M. S. Thesis, Univ. of Wisconsin 1951. — OWCZARZAK, A.: Reductional groupings and other mitotic disturbances in *Rhoeo discolor* HANCE, after treatment with sodium nucleate. Ph. D. Thesis, Univ. of Wisconsin 1953. — PATAU, K.: A correlation between separation of the two chromosome groups in somatic reduction and their degree of homologous segregation. Rec. Gen. Soc. Amer. 18, 108 (1949), Genetics 35, 128 (1950). — PATAU, K., and R. P. PATIL: Mitotic effects of sodium nucleate in root tips of *Rhoeo discolor* HANCE. Chromosoma 4, 470—502 (1951). — PERSIDSKY, M. D.: A vibratory microtome for sectioning living tissue. J. Lab. clin. Med. 42, 468—471 (1953). — SACHS, L.: Chromosome mosaics in experimental amphiploids in *Triticinae*. Heredity 6, 157—170 (1952). — SAKAMURA, T.: Über die Beeinflussung der Zell- und Kernteilung durch die Chloralisierung mit besonderer Rücksicht auf das Verhalten der Chromosomen. Bot. Mag. (Tokyo) 30, 375—399 (1916). — SRINIVASACHAR, D.: A case of sub-haploid cells in mitosis. In press 1958. VAARAMA, A.: Spindle abnormalities and variation in chromosome number in *Ribes nigrum*. Hereditas (Lund) 35, 136—162 (1949). — WILSON, G. B., and K. C. CHENG: Segregation and reduction in somatic tissues, II. The separation of homologous chromosomes in *Trillium* species. J. Hered. 40, 2—6 (1949). — WILSON, G. B., M. E. HAWTHORNE and T. M. TSOU: Spontaneous and induced variations in mitosis. J. Hered. 42, 183—189 (1951).

Dr. D. SRINIVASACHAR,
Cytogenetics Section,
Central Potato Research Institute,
Simla (Punjab), India

Dr. K. PATAU,
Department of Botany,
University of Wisconsin,
Madison, Wis., USA

Aus dem Institut für Kulturpflanzenforschung der Deutschen Akademie
der Wissenschaften zu Berlin in Gatersleben

CYTOLOGISCHE UND STOFFWECHSELPHYSIOLOGISCHE
UNTERSUCHUNGEN AM AKTIVEN MERISTEM
DER WURZELSPITZE VON *VICIA FABA* L.

I. DER EINFLUSS DER UNTERWASSER-QUELLUNG DER SAMEN
AUF DIE CHROMOSOMALE ABERRATIONSRATE

Von

R. RIEGER und A. MICHAELIS

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Februar 1958)

Inhalt

	Seite
I. Einleitung	238
II. Material und Methodik	239
III. Cytologische Beobachtungen	240
1. Die nach Vorquellung der Samen aufgetretenen Aberrationen in quanti- tativer Hinsicht	240
2. Die nach Vorquellung der Samen aufgetretenen chromosomalen Aberra- tionen in qualitativer Hinsicht	243
IV. Morphologische Kennzeichen der aus vorgequollenen Samen hervorgehen- den Primärwurzeln und Keimpflanzen	252
V. Diskussion	253
Summary	256
Literatur	256

I. Einleitung

Seitdem es gelungen ist, die mutagene Wirkung vieler physikalischer und chemischer Agenzien nachzuweisen, ist es ohne Schwierigkeiten möglich, Mutationen zu induzieren. Weitgehend unbekannt oder nur mehr oder weniger spekulativ zugänglich ist aber bis heute noch der Wirkungsmodus der Mutagene, der sich in den nach Einwirkung des jeweiligen aktiven Agens eintretenden Reaktionen ausdrücken muß, die schließlich zur Auslösung von Genmutationen bzw. von Chromosomenbrüchen führen. Der induzierten Mutabilität gegenüber wird die spontane abgegrenzt, die diejenigen Mutationen umfaßt, welche ohne kontrollierte experimentelle Einwirkung auftreten. Die gleiche weitgehende Unkenntnis des Wirkungsmodus der auslösenden Einflüsse wie im Hinblick auf die mit bekannten Agenzien induzierten Mutationen liegt auch in diesem Falle vor. Weiterhin dürfte nur ein sehr kleiner Teil derjenigen Faktoren erfaßt sein, deren Wirksamwerden das Auftreten „spontaner“ Gen- und Chromosomenmutationen hervorruft. Nach dem heu-

tigen Wissen lassen sich diese Faktoren mehr oder weniger willkürlich in zwei Gruppen einteilen. Zur ersten gehören von außen auf die Zellen einwirkende Agenzien verschiedener Art (wie Temperatur, Nährstoffmangel usw.), zur zweiten innerhalb der Gewebe bzw. Zellen entstandene, automutagen wirksame Stoffe. Beide Faktorengruppen sind mit großer Sicherheit nicht klar voneinander zu trennen, sondern gehen mit fließenden Übergängen ineinander über, da verschiedene von außen einwirkende Einflüsse zu einer Umsteuerung des normalen Stoffwechsels führen dürften, ohne das genetische Material direkt zu beeinflussen. Über einen derartigen von außen einwirkenden und den Stoffwechsel der Zellen radikal beeinflussenden Faktor, der zumindest unter ganz spezifischen Bedingungen einen Teil der spontanen Mutabilität zu erklären in der Lage ist, soll im folgenden berichtet werden. Es handelt sich um die partielle oder vollständige Anaerobiose und ihren Einfluß auf die Stabilität der Chromosomen.

Eine zumindest partielle Anaerobiose läßt sich z.B. dadurch erreichen, daß die Samen eine bestimmte Zeit lang unter Wasser vorgequollen werden. Dieses Verfahren (d.h. eine 24stündige Quellung) gehört bei *Vicia faba* heute zur cytologischen Standardmethodik und dient dazu, ein schnelleres und gleichmäßigeres Keimen zu erzeugen. Bereits 1950 haben LEVAN und LOTFY darauf hingewiesen, daß mit der 24stündigen Quellung bei *Vicia faba* eine Erhöhung der spontanen Aberrationsrate (Anaphaseauswertung) verbunden ist. In den Wurzelspitzenmitosen unserer im Zusammenhang mit einer ganz anderen Fragestellung vorgequollenen Kontrollbohnen machten wir die gleiche Beobachtung, was uns Veranlassung zu einer genaueren Untersuchung des Einflusses der Vorquellung auf die chromosomale Aberrationsrate gab¹.

II. Material und Methodik

Als Versuchsmaterial diente die Ackerbohne *Vicia faba* L. var. *minuta* Hort. ex Alefeld (= var. *minor* HARZ) c. v. „Kleine Thüringer“, deren Samen vor dem Quellen auf Größe und Einheitlichkeit ausgelesen wurden. Nach dem Quellen wurden die Bohnen entfernt, die nicht gequollen waren bzw. stark verzögert oder überhaupt nicht keimten.

Nachdem in Vorversuchen mit unterschiedlich langer Unterwasserbehandlung die Toleranzspannweite der Samen, der Anteil von Zellen mit Aberrationen in den Wurzelspitzenmitosen und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse festgestellt werden konnten, wurde ein Hauptversuch in 5 Versuchsgruppen (Samen 12, 24, 48, 72 und 96 Std unter Leitungswasser) mit 4 (für die 12- und 24stündige Unterwasserbehandlung) bzw. 6 (für die 48-, 72- und 96stündige Unterwasserbehandlung) verschiedenen Erholungszeiten (24, 48, 72, 96, 120 und 144 Std) angesetzt. Die Bezeichnung 12—48 bedeutet dabei in unserem Text, daß die Bohnen dieser Serie 12 Std unter Wasser gelegen und anschließend eine 48stündige Erholungszeit erhalten haben.

¹ Herrn Dr. K. RAMSHORN danken wir für Ratschläge und Diskussionen sehr herzlich.

Die „Behandlungen“ wurden in 200 bzw. 800 ml Bechergläsern durchgeführt, wobei etwa 5 cm Wasser über den Bohnen stand. Ein Wasserwechsel wurde während der ganzen Behandlungszeit nicht durchgeführt. Für die „Erholungszeiten“ (EZ) dienten mit Filtrierpapier ausgelegte Petrischalen (150 × 30 mm), die täglich gelüftet und mit Aqua dest. angefeuchtet wurden. Die Bechergläser und Petrischalen standen während der gesamten Versuchsdauer in einem großen Thermostaten bei einer Temperatur von $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Der Hauptversuch wurde in drei unabhängig voneinander, zeitlich hintereinander angelegten und als Wiederholungen gedachten Versuchskomplexen durchgeführt, um eine statistische Auswertung mit Hilfe der Varianzanalyse zu ermöglichen. Der Ansatz der einzelnen Versuchsserien erfolgte zum Teil getrennt, zum Teil gemeinsam, nachdem die Vorversuche den Nachweis erbracht hatten, daß getrennter bzw. gemeinsamer Ansatz keine den Zufallsbereich überschreitenden Unterschiede in der Aberrationsrate bedingen. Die größte Variabilität der Daten (und zwar in zeitlicher Hinsicht) ergibt sich erst in den Erholungszeiten. Für die Erholungsperioden wurden die Bohnen getrennt in Petrischalen ausgelegt. Jede Versuchsserie (z. B. 12—48, 12—72 usw.) bestand beim Ansatz aus etwa 20 Samen, von denen etwa 15 Wurzelspitzen nach 2stündiger Behandlung (zur Metaphaseanreicherung und Chromosomenverkürzung) in einer 0,05%igen Colchizininlösung in Alkohol-Eisessig 3:1 fixiert, nach der Feulgen-Methodik gefärbt, zu Quetschpräparaten verarbeitet und über Trockeneis-Alkohol (Methodik CONGER und FAIRCHILD 1953) in Euparal-Dauerpräparate übergeführt wurden. Die fünf besten Präparate mit der höchsten Teilungsfrequenz wurden ausgewählt und ausgewertet. Auf diese Weise gelangten nur Präparate zur Auswertung, die wenigstens 50, meistens aber über 100 exakt analysierbare Metaphaseplatten enthielten. Da sich bei Auswertung ganzer Präparate und bei Auswertung von nur 50 Zellen pro Präparat in Vorversuchen nur unwesentliche Unterschiede ergaben, wurden je Präparat 50 Zellen auf Aberrationen vom Normalzustand ausgewertet. Damit wurden in jeder Versuchsserienwiederholung 250, im Gesamtversuch je Versuchsserie 750 Metaphasen erfaßt. Als Kontrollen dienten ohne Vorquellung in Petrischalen angesetzte Samen, die nach 72-, 96-, 120-, 144- und 168stündiger Keimung fixiert wurden.

III. Cytologische Beobachtungen

Der haploide Chromosomensatz von *Vicia faba* ($2n = 12$) besteht aus 5 kleinen, subterminal inserierten Chromosomen (m oder st), und einem großen M- oder SAT-Chromosom mit medianem Centromer und einer einen Satelliten vom Chromosomenrestkörper abschließenden Sekundäreinschnürung. Das SAT-Chromosom ist etwa doppelt so groß wie jedes der m-Chromosomen, so daß das Längenverhältnis zwischen den 5 kleinen Chromosomen (m) und dem SAT-Chromosom etwa 5:2 beträgt.

1. Die nach Vorquellung der Samen aufgetretenen Aberrationen in quantitativer Hinsicht

Nach der 12 bis 96stündigen Vorquellung der *Vicia*-Samen traten keine chromosomalen Hypo- und Hyperchromasien, keine Störungen des chromatidalen „relational coiling“ und nur ganz selten Kernachromasien im Sinne MARQUARDTS (1951) auf. Ebenso war der Spiralisationszustand der

Chromosomen bis auf ganz wenige Ausnahmen normal. Die Unterwasser-Vorquellung führte zu keinen Sticky-Effekten. Verklebungen im Sinne von Sticky-Effekten traten lediglich bei unrichtig angewandten Colchizingaben auf und ergaben dann sog. „Star-Metaphasen“ mit Verklebungen besonders der kleinen Schenkel der m-Chromosomen proximal zum Centromer.

Nach der Behandlung wiesen fast alle Zellen zahlreiche, stark lichtbrechende Einlagerungen von Stoffwechselprodukten auf, die sich im Laufe der Dauerpräparierung im Alkohol nahezu vollständig lösten, so daß die Dauerpräparate einwandfrei auswertbar waren. Gegenüber den Kontrollen ergab sich ein zum Teil außerordentlich starker Anstieg in der Anzahl von Zellen mit lokalen Achromasien (MARQUARDT 1950) bzw. potentiellen Brüchen (pB''), mit chromatidalen (B') und chromosomalen Fragmentationen (B'') und Reunionsprodukten der Bruchflächen. Diese vier

Aberrationskomplexe

wurden in unsere Auswertungen aufgenommen und vergleichende quantitative Untersuchungen an der Kontrolle, den einzelnen Behandlungsstufen und den verschiedenen EZ durchgeführt. Fixierungen nach 24stündiger EZ blieben in allen Behandlungsstufen auf Grund einer ganz verschwindend geringen Mitosefrequenz in den Wurzelspitzen unauswertbar. Mitosen in einer Frequenz, die die Analyse einer ausreichenden Anzahl von Metaphasen nach der angegebenen Colchizinbehandlung gestatteten, traten erst nach 48stündiger EZ auf.

Der Anteil von Zellen mit Aberrationen in den einzelnen Versuchsserien, bezogen auf die jeweils geprüften 750 Zellen jeder Serie, ist in Abb. 1 in Prozenten wiedergegeben. Die Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der mit der absoluten Anzahl aberranter Zellen pro Wurzelspitze durchgeführten Varianzanalyse. Aus den Varianzen (s^2) ist die geringe Varia-

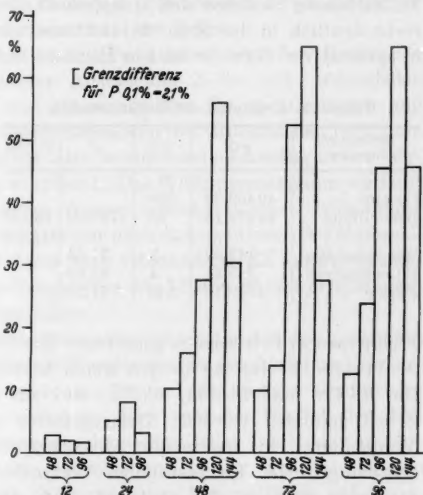


Abb. 1. Der prozentuale Anteil aberranter Zellen in den verschiedenen Versuchsserien (750 Zellen = 100 %)

bilität zwischen den Wurzelspitzen bzw. Wiederholungen einer Versuchsserie im Gegensatz zu den sehr gut gesicherten Werten zwischen den Versuchsserien klar ersichtlich. An der linken Seite der Abb. 1 ist die für die Prozentwerte umgerechnete Fehlergrenze angegeben. Größere Unterschiede im Verhalten der Wurzeln ausgedrückt im Abweicherprozentsatz finden sich, wie Abb. 1 erkennen läßt, nur zwischen den Behandlungszeiten 12 und 24 Std einerseits und 48, 72 und 96 Std andererseits. In gewisser Hinsicht nimmt die Vorquellzeitspanne von 48 Std noch eine Mittelstellung zwischen den Gruppen 12, 24 und 72, 96 ein, was sich recht deutlich in der Stufe 48—120 auszudrücken scheint. Besonders in qualitativer Hinsicht und in Hinsicht auf die Zahl der Brüche und

Reunionen pro aberranter Zelle erfährt dieser Unterschied noch eine Vertiefung, auf die in Abschnitt IIIb näher eingegangen wird.

Der Abweicherprozentsatz von jeweils 750 ausgewerteten Meta-

Tabelle 1. *Ergebnisse der Varianzanalyse*

Streuungs- ursache	SQ	FG	s ²	F-Test
Gesamt . . .	49469,38	389		
Behandlung .	44972,18	25	1798,89	160,63 (1,54)
Wiederholung	143,67	2	71,84	
Wurzelspitzen	343,41	4	85,85	
Fehler	4010,12	358	11,20	

Fließpapier in Petrischalen gehaltenen Kontrollen 0—72, 0—96, 0—120, 0—144 und 0—168 lag in den ersten beiden Stufen bei 0%, während für 0—120 und 0—144, 0,67% und für 0—168 0,27% aberranter Zellen gefunden wurden. Demgegenüber ergab sich für 12stündige Vorquellung ein maximaler Abweicherprozentsatz von 2,9% nach 48stündiger EZ, für 24stündige Vorquellung ein Abweicherprozentsatz von 8,1% in der Stufe 24—72¹. Die Differenz zwischen dem Kontrollwert 0,67 und dem Wert 2,9 (12—48) ist (mit $P=0,1\%$) sehr gut gesichert. Mit fortlaufender Verlängerung der EZ ergab sich für die 12stündige Vorquellung ein allmählicher Abfall der Anzahl abweichender Zellen, während das Abweichermaximum mit 8,1% bei 24stündiger Vorquellung erst nach 72stündiger EZ vorlag. Diesen beiden ersten Vorquellzeiten gegenüber, die unter sich noch einmal bezüglich der Maxima divergierten, verhielten sich die Vorquellzeiten von 48, 72 und 96 Std bezüglich des Zeitpunktes maximalen Abweicherauftretens einheitlich. In allen drei Fällen lag das Maximum unter unseren experimentellen Bedingungen bei 120stündiger EZ und stimmte darüber hinaus in den Stufen 72—120 und 96—120 mit 65,1% gut überein (48—120 56,0%). Eine ebenfalls befriedigende Übereinstimmung ergab sich für die 48stündige EZ, während nach 72- und 96stündigem Ver-

¹ Vorquellung mit entlüftetem Aqua dest. erhöht und verschiebt die Maxima der 12- und 24stündigen Behandlungen.

bleiben auf Fließpapier gewisse Unterschiede zwischen den drei Behandlungsstufen zu registrieren sind. Diese Unterschiede sind zwar deutlich, gaben uns aber keine Veranlassung, für die einzelnen Stufen eine separate Erklärung zu suchen. Charakteristisch und allein bedeutsam erscheint uns in diesem Zusammenhang lediglich die überzeugende Einheitlichkeit in der Tendenz der drei letzten Behandlungszeiten zu sein, die sich in ihrer Auswirkung den 12- und 24stündigen Vorquellungen gegenüber klar unterscheiden, und zwar einmal nach der Lage der Abweichermaxima und weiterhin nach dem prozentualen Anteil aberranter Zellen an der ausgewerteten Gesamtzahl der Zellen.

12- und 24stündige Samenvorquellung führt zwar den Kontrollen gegenüber zu einem gesicherten Anstieg der Zellen mit „potentiellen Brüchen“, chromatidalen und chromosomalen Fragmentierungen und den daraus resultierenden, durch Reunionen der Bruchflächen bedingten Umbauten, ist aber doch mehr oder weniger unerschwerlich in der Wirkung auf die chromosomale Stabilität. Das Wirkungsmaximum wird mit 72stündiger Vorquellung unter Wasser erreicht; längere Behandlung steigert den Abweicherprozentsatz nur noch unwesentlich. Der Maximalwert an Aberrationen wird dabei nach 120stündiger EZ auf Fließpapier einheitlich für die 3 Behandlungszeiten 48, 72 und 96 Std erreicht, um dann wieder allmählich abzusinken.

Ebenso gleichmäßig wie die Aberrationsmaxima in den drei genannten Behandlungszeiten nach 120 Std EZ auftreten, ist der Abfall im Prozentsatz der aberranten Zellen nach 48-, 72- und 96stündiger Vorquellung mit der 144stündigen EZ verknüpft. Hier wird der Einfluß der Zells Selektion, die zur Eliminierung unbalancierter Zellen führt, klar ersichtlich. Gleichzeitig erfolgt eine Verschiebung in der Qualität der pro aberrante Zelle feststellbaren chromosomalen Abnormitäten, auf die im Zusammenhang mit der Darstellung des qualitativen Effektes der Vorquellung, d.h. im Zusammenhang mit der Darstellung der Aberrationstypen, im folgenden noch genauer eingegangen wird.

2. Die nach Vorquellung der Samen aufgetretenen chromosomalen Aberrationen in qualitativer Hinsicht

Die notwendige Voraussetzung zum Eintritt chromosomaler Strukturarrangements und gleichzeitig der einfachste Typ der Chromosomenaberration ist der Eintritt von Brüchen auf chromatidaler und chromosomaler Ebene und die Trennung der Bruchflächen. Während im ersten Teil der Arbeit summarisch die Anteile an aberranten Zellen in den einzelnen Behandlungszeiten und Erholungsperioden miteinander verglichen und den Kontrollen gegenübergestellt wurden, stehen im folgenden die einzelnen Bruch- und Reunionsergebnisse nach Samenvorquellung im Vordergrund des Interesses. Erfäßt wurden in diesem

Zusammenhang 5 Kategorien am Chromosom gesetzter und sich in Strukturveränderungen ausdrückender Effekte, nämlich die als achromatische Lücke erkennbar werdenden „potentiellen Brüche“ oder „lokalen Achromasien“, die Chromatiden- und Chromosomenbrüche, welche nicht mit irgendwelchen Reunionen (ausgenommen Schwesterchromatidenreunionen) verbunden waren, die reziproken Chromatiden-translokationen (T') und schließlich die Triradiale.

Ob es sich bei den lokalen Achromasien, die in Abb. 6 als potentielle Brüche (pB') registriert sind, um lokalisierte Nukleinsäurestörungen handelt, wie MARQUARDT (1951) vermutet, oder um Bruchvorstufen bzw. restituierte Brüche, soll in diesem Zusammenhang nicht näher erörtert werden. Als chromatidale Brüche ohne Reunionen wurden diejenigen gewertet, die durch die räumliche Trennung eines Chromatidenabschnittes vom Chromatidenrest gekennzeichnet waren und wobei in manchen Fällen noch eine Rotation des Fragmentes um die Achse der unbeschädigten Chromatide eingetreten war. Chromosomale Brüche waren im allgemeinen durch die Aufhebung jeder räumlichen Verbindung zwischen dem abgetrennten azentrischen und dem zentrischen Chromosomenteil gekennzeichnet. Zur Entstehung der reziproken chromatidalen Translokationen ist das Auftreten von je einem Chromatidenbruch in zwei Chromosomen erforderlich und ein entsprechender Reunionsvorgang, welcher zu typisch kreuzförmigen Zweierkonfigurationen führt. Triradiale, d. h. dreiarmlige Chromosomenumbauten, sind entweder das Ergebnis von zwei Chromosomenbrüchen in zwei Chromosomen und einer chromatidalen Restitution zur Vorbruchstruktur oder eines Chromosomen- und Chromatidenbruches mit anschließender Einfügung des chromosomalen Fragmentes in die durch den Chromatidenbruch eingetretene „Lücke“ in beiden Fällen.

Neben diesen in die Auswertung einbezogenen Hauptaberrationstypen trat eine Reihe von wahrscheinlich auf intrachromosomale Umbauten zurückzuführenden Strukturveränderungen auf, die in die Auswertung nicht einbezogen wurden. Absichtlich nicht mit ausgewertet wurden darüber hinaus Brüche in der sekundären Einschnürung der SAT-Chromosomen. Es wird zwar von verschiedenen Autoren auf einen bevorzugten Brucheintritt in dieser Region hingewiesen, aber wir sahen uns veranlaßt, nach unserer Behandlung auf die Erfassung der Brüche in dieser Region in der ersten Wurzelspitzenmitose zu verzichten, weil wir den Eindruck hatten, daß in der Sekundäreinschnürung durch die Quetschpräparation besonders leicht artifizielle Brüche zu erzielen sind. Die Auswertung von Metaphaseplatten der zweiten und evtl. dritten Wurzelspitzenmitose, in denen im allgemeinen keine azentrischen Fragmente mehr auftraten, scheint diese Vorsicht zu rechtfertigen, da zu diesen Zeitpunkten relativ wenig Satelliten fehlten, obwohl nach den aus

der ersten Wurzelspitzenmitose zu gewinnenden Eindrücken gerade das Gegenteil zu erwarten gewesen wäre. Bei unseren Festlegungen der Anzahl der Bruch- und Reunionsereignisse pro Behandlungsstufe (Abb. 6), bezogen auf die 750 ausgewerteten Zellen der drei Versuchswiederholungen, handelt es sich somit um Minimalangaben. Die tatsächlichen Werte dürften etwas höher als angegeben liegen. Sowohl bei der quantitativen wie qualitativen Festlegung der Aberrationen wurden nur Zellen verwertet, deren ganzer Chromosomenbestand ohne Schwierigkeiten zu analysieren war. In einigen Fällen ließen sich nicht alle in den Einzelzellen vorhandenen Umbauten exakt nach ihrer Entstehung festlegen, so daß auch hier nur eine Minimalzahl von Bruch- und Reunionsereignissen in die Auswertung der betreffenden Zellen aufgenommen und auf die unklaren Umbauten verzichtet wurde. In einer Reihe von Zellen traten Subchromatidentranslokationen auf. Auch auf ihre zahlenmäßige Erfassung wurde verzichtet, um Unsicherheiten in der Auswertung zu vermeiden. Sehr kleine als „minutes“ oder „sub-minutes“ bezeichnete Fragmente in freier oder angehefteter Form wurden nur in ganz wenigen Ausnahmefällen gefunden. Ebenso waren augenscheinlich chromatidale freie Fragmente in den Metaphasen so gut wie gar nicht auffindbar.

Alle Reunionen — abgesehen von den Triradialen — waren auf chromatidaler Basis erfolgt. Reunionsprodukte nach Eintritt den ganzen Querschnitt betreffender Brüche in verschiedenen Chromosomen traten nicht auf oder waren zwanglos als Auflösungsprodukte von reziproken Chromatidentranslokationen, wobei unter anderem dizentrische Chromosomen und komplementäre azentrische Bruchstücke in der zweiten Wurzelspitzenmitose auftreten, erklärbar. In einigen wenigen Fällen wurden Ringchromosomen gefunden, die zwar als Reunionsprodukte auf chromosomaler Ebene angesehen werden könnten, aber wohl zwangloser mit intrachromosomalen Umbauten auf chromatidaler Stufe zu erklären sind.

Das Fehlen von Reunionsprodukten nach Eintritt von Chromosomenbrüchen dürfte seine Erklärung in einer sich der Fragmentation und der darauf folgenden Chromosomenreplikation im Interphasekern unmittelbar anschließenden Schwesterreunion der Bruchflächen finden. Chromosomenbrüche, die keine Schwesterreunion eingegangen waren, wurden nur selten gefunden. Die Abb. 2—5 geben einen Überblick über einen Teil der nach Vorquellung entstandenen chromosomalen Umbautypen. Die maximale in einer Zelle gefundene Bruchfrequenz betrug 2 Chromosomen- und 8 Chromatidenbrüche.

Die in der Abb. 6 in absoluten Werten angegebenen chromosomalen Anteile, die auf die einzelnen Aberrationstypen entfallen, beziehen sich jeweils auf die insgesamt 9000 in 750 ausgewerteten Zellen befindlichen



Abb. 2—5. Metaphaseplatten mit Chromosomenmutationen nach Samenvorquellung.
 Abb. 2. 2 zentrische Fragmente, 1 lokale A-chromasie (pB' SAT-Schenkel) + 1 Chromatidentranslokation (T' SAT-m). Abb. 3. 1 Triradial + 1 zentrisches Fragment, 1 Chromatidentranslokation (T' SAT-m), 1 unvollständige Tripeltranslokation (T' m-m-m).
 Abb. 4. 1 Tripeltranslokation (T' SAT-m-m). Abb. 5. 1 Triradial + 1 zentrisches Fragment, 1 zentrisches Fragment + 1 angeheftetes azentrisches Fragment (Schwesterchromatidenreunion in beiden Fragmenten), 1 zentrisches Fragment (Schwesterchromatidenreunion).
 Optik: Zeiss-Lumipan, Zeiss-Miflex mit Kleinbildkamera, Objektiv Apo 90 mit Projektiv K 6,3, Trichromfilter gelb-grün; Agfa-Isopan-FF-Film. Vergr. 2000 \times

Chromosomen. In Prozenten von 9000 ausgedrückt sind damit für die Maxima der einzelnen Vorquellstufen mit bzw. ohne (in Klammern) Berücksichtigung der potentiellen Brüche nach den Vorquell- und Erholungszeiten 12—48 0,27 (0,19), 24—72 0,88 (0,68), 48—120 7,45 (6,84), 72—120 11,10 (10,16) und 96—120 11,71 (10,80)% der Chromosomen an Bruch- und Reunionsvorgängen beteiligt. Ebenso wie auch bei der quantitativen Auswertung der aberranten Zellen, setzt das Wirkungsmaximum nach 72stündiger Vorquellung ein. Eine Vorquellung von 96 Std steigert den Effekt nicht mehr. Nach der 12- und 24stündigen Vorquellung sind die Wirkungen der Behandlung noch niedrig und überschreiten nicht 1% der Chromosomengesamtzahl, während die 48stündige Vorquellung wiederum eine Mittelstellung einnimmt. Die 72- und 96-Std-Vorquellstufen stimmen in der Gesamtzahl der an Fragmentationseignissen und Umbauten beteiligten Chromosomen praktisch überein, während die 48stündige Vorquellzeit in dieser Hinsicht erheblich niedriger liegt, da weniger Aberrationen pro aberrante Zelle auftreten. Dieser Unterschied verwischt sich weitgehend in Abb.1, wo nur summarisch alle irgendwie gestörten Zellen erfaßt wurden, ohne die Anzahl der Störungen pro Zelle zu berücksichtigen.

Damit steht fest, daß sich der durch die Vorquellung gesetzte Effekt bis zur Vorquellzeit von 72 Std erhöht und mit 96stündiger Vorquellung

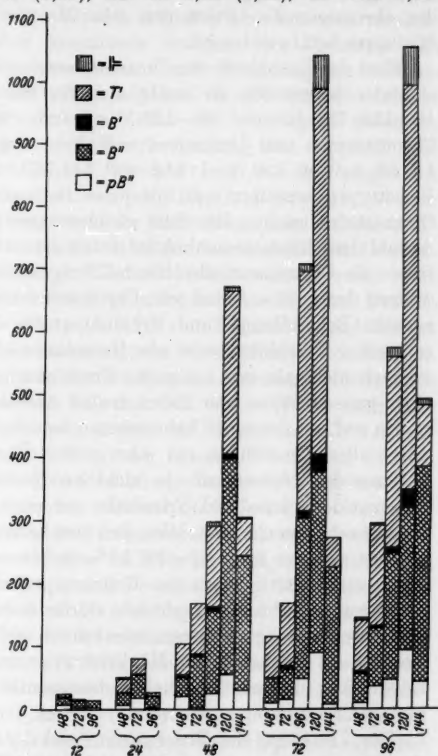


Abb. 6. Der Anteil an den verschiedenen Aberrationen beteiligter Chromosomen (Ordinate) bezogen auf die insgesamt 9000 in je 750 Zellen befindlichen Chromosomen

keine weitere Steigerung erfährt. Die bis zu dieser Vorquellzeit faßbaren Effekte stellen fast ausschließlich chromosomale Aberrationen dar.

Längere Vorquellung als 96 Std führt zu starken Abweichungen von der normalen Wurzelentwicklung und erschwert die exakte Erfassung der chromosomalen Störungen sehr, da die Mitosefrequenz auf ein Minimum herabgesetzt ist.

Wird das Verhältnis der Chromosomen- und Chromatidenbrüche zueinander festgestellt, so ergibt sich für die Stufen 12—48, 24—72, 48—120, 72—120 und 96—120, die jeweils die größte Zahl aberranter Chromosomen und Umbauten enthalten, eine jeweilige Relation von 1:0,55, 1:0,74, 1:0,78, 1:1,92 und 1:2,78, d.h. das Verhältnis beider Bruchtypen erweitert sich mit jeder Behandlungsstufe zugunsten der Chromatidenbrüche. Bei einer gleichzeitigen Steigerung der absoluten Anzahl der Chromosomenbrüche treten demnach relativ mehr Chromatiden- als Chromosomenbrüche bei fortgesetzter Vorquellung ein. Bei weitem der größte Anteil von Chromatidenbrüchen ist in allen untersuchten Behandlungs- und Erholungsstufen Reunionen in Form von reziproken Translokationen oder Triradialen eingegangen. Dabei wurde vielfach mehr als eine reziproke Translokation pro Zelle gefunden; in einer ganzen Reihe von Fällen traten darüber hinaus Tripeltranslokationen auf, an denen 3 Chromosomen beteiligt waren (Abb. 4). Es trat unter allen Umständen ein sehr großer Überschuß an geradzahligen Chromatidenbrüchen auf, da nicht an Reunionen beteiligte „offene“ Chromatidenbrüche und Triradiale nur einen geringen Anteil an der Gesamtzahl von chromatidalen Brüchen hatten und im Höchstfalle (abgesehen von der Stufe 12—48) 10% der Gesamtzahl ausmachten. Für dieses recht deutliche an den Reunionsprodukten ermittelte paarweise Auftreten der Chromatidenbrüche dürfte wohl die Restitution nicht an Umbauten beteiligter Chromatidenbrüche zur Vorbruchstruktur verantwortlich zu machen sein. Möglicherweise erfahren nur jene Chromatidenbrüche Reunionen, die in bestimmter gegenseitiger und lage-mäßiger Zuordnung zueinander entstehen.

Die Verteilung der Bruchpunkte und der lokalen Achromasien über den Chromosomensatz von *Vicia faba* war in unseren Versuchen offensichtlich keineswegs zufallsgemäß, wie z. B. nach Einwirkung von γ -Strahlen (FORD 1948) und Röntgenstrahlen (DEUFEL 1951). Bei einer zufallsgemäßen Verteilung wäre entsprechend den chromosomalen Längenverhältnissen des Chromosomensatzes eine theoretische Verteilung von 5:2 auf die m- und SAT-Chromosomen zu erwarten. Der von uns für das Gesamtmaterial ermittelte Wert liegt bei 5:0,62, d.h. die m-Chromosomen waren bevorzugt an den Brüchen und Achromasien beteiligt. Der Wert kann in dieser Höhe allerdings nur unter Vorbehalten gelten, da die große Anzahl echter und nicht echter, auf Quetsch-

effekte zurückzuführender Brüche in der sekundären Einschnürung der SAT-Chromosomen zumindest nicht in den EZ bis einschließlich zur Stufe 120 berücksichtigt worden ist. Nach 144stündiger EZ, nach der praktisch alle echten azentrischen Fragmente ausgemerzt sind (zweite bzw. auch dritte Mitose), läßt sich aber eine den tatsächlichen Verhältnissen näher kommende Relation des Eintrittes von lokalen Achromasien und chromatidalen und chromosomalen Brüchen auf den m- und SAT-Chromosomen angeben, da alle Quetschartefakte auszuschließen sind, wenn in den Zellen ein oder beide Satelliten fehlen. Dabei ergab sich eine Bruchverteilung für m:SAT wie 5:1,14. Für die Stufen 48—144, 72—144 und 96—144 zeigt sich eine gute Übereinstimmung insofern, als 19,4, 21,2 bzw. 19,1% aller Brüche (einschließlich Achromasien) im SAT-Chromosom auf die SAT-Einschnürung entfallen. Der Wert 5:1,14, der den tatsächlichen Gesamtverhältnissen, die für die kurzen EZ nicht erfaßt wurden, recht nahe kommen dürfte, unterscheidet sich grundlegend von den von DEUFFEL (1951) nach Urethaneinwirkung (5:3,5), von KIHLMANN und LEVAN (1951) nach 8-Äthoxycoffeineinwirkung, von WOLL (1953) nach Nukleinsäureeinwirkung (5:14,3), von ENGEL (zit. bei OEHLKERS 1953) nach Einwirkung von Alkaloiden (5:7,2) und von GLÄSS (1956) nach Einwirkung von Schwermetallsalzen (5:9,8, für Kupfer aber 5:1,0) gefundenen Werten insofern, als sich nach unserer Behandlung für das SAT-Chromosom eine niedrigere Bruchfrequenz als nach der theoretischen Erwartung von 5:2 ergibt, während die zitierten Autoren nach ihren Behandlungsmethoden gerade umgekehrte Verhältnisse vorfanden. Bevorzugte Bruchregionen auf dem SAT-Chromosom waren nach Vorquellung die Primäreinschnürung und die proximalen Abschnitte. Eine Abweichung vom theoretischen, bei zufallsgemäßigem Brucheintritt zu erwartenden Verhältnis der Bruchverteilung über die gesamte Länge der m- und SAT-Chromosomen (5:2) in unserem Sinne, d.h. bevorzugter Eintritt in den kleinen m-Chromosomen, fanden FORD (1948) bei Senfgaseinwirkung, LEVAN und LOTFY (1950) bei 24stündiger Samenvorquellung und REVELL (1953) nach Einwirkung von HN_3 , Diepoxyd und organischen Peroxyden. Die Angaben von FORD (1948) und LEVAN und LOTFY (1950) wurden von GLÄSS (1956, S. 275) irrtümlich im umgekehrten Sinne zitiert.

Daraus ergibt sich, daß die beiden Chromosomengruppen des Chromosomensatzes von *Vicia faba* nach Einwirkung verschiedener Agenzien bzw. nach verschiedenen Behandlungsmethoden eine durchaus unterschiedliche Bruchfrequenz aufweisen können, so daß wohl nicht generell von einer „speziellen Bruchempfindlichkeit des großen Chromosoms“ (OEHLKERS 1953) gesprochen werden kann, zumal GLÄSS (1956) nachweisen konnte, daß die Einwirkung von Kupfernitrat zu weniger

Brüchen im SAT-Chromosom führt (Verhältnis 5:1,0) als die anderen getesteten Schwermetallsalze. Ebenso wie auf dem SAT-Chromosom traten auf den m-Chromosomen nach Samenvorquellung ganz bevorzugte, am Bruchgeschehen beteiligte Regionen auf, auf die aber im Zusammenhang mit einer anderen Fragestellung in einer anderen Publikation eingegangen werden soll.

Bezüglich des qualitativen Aberrationsspektrums ergibt sich eine besonders einschneidende Veränderung nach 144stündiger EZ in den

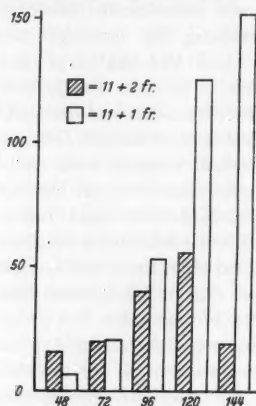


Abb. 7. Die zahlenmäßige Verschiebung der Zellen mit einem zentrischen und azentrischen Fragment gegenüber den Zellen ohne azentrisches Fragment mit fortschreitender Erholungszeit. (Ordinatio = Anzahl der Zellen; Abszisse = Erholungszeiten in Stunden)

Behandlungsstufen 48, 72 und 96. Zu diesem Zeitpunkt sinkt nämlich der Anteil an Aberrationen beteiligter Chromosomen stark ab, und die meisten Zellen befinden sich mindestens in der zweiten Wurzelspitzenmitose, die am Fehlen der meisten azentrischen Fragmente und dem Auftreten von Auflösungsprodukten der nach Eintritt von reziproken chromatidalen Translokationen entstandenen Zweier- und Dreierverbände kenntlich wird. Die in der Säule 144 in Abb. 6 angegebenen T' stellen dabei bis auf wenige Ausnahmen (s. Abb. 2, 5) nur noch zentrische, dizentrische und azentrische Auflösungsprodukte von Translokationen dar. Translokationskonfigurationen und Triradiale fehlen ebenso wie die meisten azentrischen Fragmente in dieser Stufe fast völlig, d.h. die Wirkung der Vorquellung hat sich bis zu dieser Zeit praktisch erschöpft.

Während nach 144stündiger EZ im wesentlichen nur noch in der zweiten und in späteren Mitosen befindliche Zellen erfaßt werden, überschneiden sich in den vorherliegenden EZ die erste und spätere Mitosen. Sehr klaren zahlenmäßigen Ausdruck findet diese Tatsache in der Abb. 7, in der für aufeinanderfolgende EZ das zahlenmäßige Verhältnis von Zellen mit zentrischen und azentrischen und Zellen mit ausschließlich zentrischen Fragmenten, ausgedrückt in Mittelwerten aus den 5 Behandlungsstufen, zusammengefaßt ist. Dabei sind nur Zellen mit einem Chromosomenbruch berücksichtigt worden.

Zu einem geringeren Anteil traten schon in den Fixierungen der Stufe 12–48 Kleinkerne auf, deren Anzahl sich mit Verlängerung der Behandlungs- und Erholungszeiten steigerte. Eine Auswertung der Kleinkernzahlen und der Anaphasestörungen in nicht mit Colchizin be-

handelten Wurzelspitzen wurde nicht durchgeführt. Es traten zum Teil erhebliche Anaphasestörungen auf, ihre Erfassung kann aber nur zu sehr summarischen und wenig diffizilen Aussagen führen, und aus diesem Grunde wurde auf ihre Erfassung verzichtet.

Die starke gegenseitige Überschneidung der ersten und zweiten Wurzelspitzenmitose bzw. ein asynchrones In-Teilung-Treten der Ruhekerne könnte außerdem ein Grund dafür sein, daß der Anteil aberranter Zellen (Abb. 1) bzw. die Aberrantengesamtzahl ausgedrückt in der Anzahl gebrochener bzw. an Umbauten beteiligter Chromosomen (Abb. 6) von der 48- bis zur 120stündigen EZ (abgesehen von 12- und 24stündiger Vorquellung) ansteigt, wenn von der sehr wahrscheinlichen These ausgegangen wird, daß der cytologisch faßbare Effekt im Ruhekerne gesetzt wird. Darüber hinaus tritt ein erheblicher Teil der Brüche erst nach der chromosomalen Replikation ein und manifestiert sich in Form von Chromatidenbrüchen bzw. entsprechenden Reunionsprodukten. Träfe die Vorstellung des asynchronen Überganges von der Interphase zur Prophase, verbunden mit einer zum Teil erheblichen Teilungsverzögerung der Ruhekerne zu, so sollte der Anteil der Chromatidenbrüche um so höher werden können, je länger der Kern in der Interphase verbleibt. Dieser Sachverhalt deckt sich wenigstens teilweise mit den experimentellen Daten, da nach 72- und 96stündiger Vorquellung das Verhältnis von Chromosomen- zu Chromatidenbrüchen bis zur 120stündigen EZ zugunsten der Chromatidenbrüche weiter wird. Dabei darf aber nicht außer acht gelassen werden, daß es sich bei allen oder einem erheblichen Teil der Chromosomenbrüche auch um Isolocusbrüche nach der chromosomalen Replikation handeln könnte und echte, den ganzen Querschnitt vor der identischen Reduplikation betreffende Chromosomenbrüche gar nicht auftreten oder nur einen relativ geringen Anteil am Gesamtbruchgeschehen haben. Dieser Einwand dürfte allerdings wenig begründet sein.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit der relativ spät liegenden Aberrationsmaxima, die nicht ohne weiteres auszuschließen ist, wäre darin zu sehen, daß die unter dem Einfluß der Vorquellung entstehenden, die Stabilität der Chromosomen beeinflussenden Agenzien erst allmählich angereichert werden und ihren Haupteinfluß im Verlaufe der Erholungsperioden ausüben. Schließlich käme als dritte Erklärungsmöglichkeit hinzu, daß zwar der größte Teil der mit der Vorquellung verbundenen Wirkungen schon mit Beginn der ersten Mitose gesetzt ist, daß es sich aber in der Mehrzahl um chromosomale Labilitäten handelt, die erst in der Ana- oder Telophase der ersten Wurzelspitzenmitose zu echten Brüchen führen und schließlich in der Mitose II oder später als Umbauten faßbar werden.

Nach diesen beiden letzten Vorstellungen würde ein großer Teil der Aberrationen erstmalig in der zweiten Wurzelspitzenmitose manifest.

Dafür, daß auch nach der ersten Mitose in einer Reihe von Fällen noch cytologische Effekte gesetzt werden können, sprechen diejenigen Zellen, in denen neben Translokationskonfigurationen und Triradialen noch potentielle Brüche und Auflösungsprodukte von Translokationen vorlagen bzw. ein Teil der nach Chromosomenbrüchen zu erwartenden azentrischen Fragmente bereits eliminiert war (Abb. 5). Die Vorquellung ist also mit einer nachweisbaren Spätwirkung verbunden, die allerdings, gemessen an der Zahl derartiger „Mischzellen“, ohne sehr große Bedeutung zu sein scheint.

Wenn uns auch die zuerst angeführte Erklärung der Maximaverteilung augenblicklich als die wahrscheinlichste erscheint, soll und kann ein endgültiges Urteil im gegenwärtigen Zeitpunkt der Untersuchungen noch nicht gefällt werden. Unter Umständen sind alle drei angeführten Möglichkeiten mit unterschiedlicher Bedeutung an der Entstehung der späten Aberrationsmaxima beteiligt.

Zusammenfassend ergibt sich, daß durch die Samenvorquellung bei *Vicia faba* bis zu 65% aller Zellen und bis zu etwa 12% aller Chromosomen nach den angewandten Behandlungszeiten irgendwelche Aberrationen aufweisen bzw. an Aberrationen beteiligt sind. Die Vorquellung hat damit einen die spontane Aberrationsrate stark erhöhenden Einfluß, der in seiner Stärke nach den längeren Vorquellzeiten die gebräuchlichen Dosen vieler physikalischer und chemischer Mutagene übertrifft und ein auch für andere Mutagene bekanntes Spektrum von Chromosomenmutationen hervorruft. Dabei ist mit der Vorquellung in den untersuchten Bereichen keine der häufig mit der Einwirkung chemischer und physikalischer Mutagene verbundenen, allgemein physiologischen Schädigungen verknüpft, die sich in Spiralisationsfehlern, Sticky-Effekten, Hypo- und Hyperchromasien usw. ausdrücken. Die Bruchverteilung über die gesamte Chromosomenlänge ist nach vorläufigen Untersuchungen nicht zufallsgemäß, betrifft bevorzugt bestimmte Regionen der Chromosomen und die m-Chromosomen häufiger als die SAT-Chromosomen.

IV. Morphologische Kennzeichen der aus vorgequollenen Samen hervorgehenden Primärwurzeln und Keimpflanzen

Im Bereich der angewandten 12- bis 96stündigen Vorquellzeiten ergaben sich an den Primär- und Sekundärwurzeln, abgesehen von einer verzögerten Wachstumsrate, kaum morphologische Abnormitäten. Erst nach 120stündiger Vorquellzeit traten charakteristische Störungen in der Entwicklung der Primärwurzeln auf. Die Wurzelspitzen zeigten starke Verdickungen, und der erste Millimeter starb mehr oder weniger schnell ab. Anschließend wurden die Spitzen von weiter auf den Samen zu gelegenen Wurzelregionen überwachsen.

Durch Fixierung der Plumula behandelter Samen ließ sich nachweisen, daß dort die gleichen chromosomalen Aberrationen wie in den Primärwurzeln durch die Vorquellung gesetzt werden. Auf Grund der allgemein niedrigeren Teilungsrate in der Plumula wurde auf eine quantitative Analyse der Aberrationen verzichtet.

Um die Vitalität der behandelten Samen zu überprüfen, wurden sowohl Samen mit intakten Primärwurzeln als auch solche mit abgenommenen Wurzelspitzen in Pikierkästen ausgelegt. Die daraus hervorgehenden Keimpflanzen zeigten zunehmend mit verlängerter Samenvorquellung und beginnend mit der 48stündigen Vorquellzeit morphologische Störungen der Blattentwicklung und waren durch ein auffälliges Fleckenmosaik auf den Blättern gekennzeichnet, das im allgemeinen bis zum vierten oder fünften Blattpaar verschwand. Nach 24stündiger Vorquellung traten nur vereinzelte Flecke auf den Blättern auf.

Dieses Fleckenmosaik ist ohne Zweifel die Folge der durch die Vorquellung gesetzten cytologischen Abnormitäten (Chromosomenmutationen). In seinem relativ schnellen Verschwinden mit fortschreitender Entwicklung drücken sich in Analogie zu den Verhältnissen in den Wurzelspitzen die Vorgänge der Zellselektion aus.

V. Diskussion

In der Einleitung wurde darauf hingewiesen, daß mit der Quellung eine zumindest partielle Anaerobiose verbunden sein muß. Es gilt an dieser Stelle, die Frage zu prüfen, ob die Anaerobiose und die unzweifelhaft mit ihr verbundene, tiefgreifende Umstellung des Zellstoffwechsels für das Eintreten der in den Wurzelspitzen festgestellten chromosomalen Aberrationen verantwortlich gemacht werden kann oder ob andere, mit der wenig diffizilen Behandlungsmethode möglicherweise verbundene Einflüsse dazu in Verbindung zu bringen sind. Während der jeweiligen gesamten Behandlungsperiode wurde kein Wasserwechsel durchgeführt. Das gibt Veranlassung dazu, daß in relativ kurzer Zeit eine beträchtliche bakterielle Verunreinigung des Wassers eintritt, womit der Verdacht nahe gelegt wird, daß die cytologischen Effekte unter Umständen von außen induziert werden und etwa auf die Einwirkung bakterieller Stoffwechselprodukte, die in das Vorquellwasser gelangen, zurückzuführen sind. Dagegen spricht allerdings, daß sich die mit der Vorquellung verbundenen Wirkungen in den Versuchswiederholungen mit einer den normalen Fehler nicht überschreitenden Wahrscheinlichkeit reproduzieren lassen, während der Grad der jeweiligen Verunreinigung dabei keineswegs einheitlich ist. Mit dieser Tatsache dürfte zwar ein Hinweis darauf vorliegen, daß die mit der Quellung verbundenen cytologischen Effekte nicht auf Verunreinigungen des flüssigen Milieus zurückzuführen sind, aber eine solche Vermutung kann damit noch nicht als beweis-

kräftig gelten. Um einen klaren Gegenbeweis gegen diesen Einwand zu erlangen, wurden Versuche durchgeführt, in denen auf die Quellung unter Wasser verzichtet werden konnte. Zu diesem Zweck wurde eine Anaerobiose dadurch geschaffen, daß die Bohnensamen im Exsikkator auf wassergetränktem Zellstoff in einer feuchten Stickstoffatmosphäre bei 24° für ebenfalls 24 bis 96 Std gehalten wurden. Durch diese Versuchsanordnung konnten in den Wurzelspitzen die gleichen cytologischen Aberrationen wie nach Samenvorquellung hervorgerufen werden. Die Keimpflanzen zeigten, beginnend mit der 48stündigen „Stickstoffbehandlung“ der Samen, sowohl charakteristisches Fleckenmosaik als auch morphologische Blattabnormitäten.

Damit dürfte wohl kaum zu bezweifeln sein, daß die cytologische Wirkung der von uns angewandten Samenvorquellung auf den damit verbundenen Sauerstoffmangel¹ zurückzuführen ist. Gleichzeitig wird mit den Ergebnissen der Keimungsversuche in Stickstoffatmosphäre nachgewiesen, daß die mit der Quellung unter Wasser zweifellos verbundene CO₂-Anreicherung keinen wesentlichen Einfluß auf die Erhöhung der spontanen Aberrationsrate ausübt, da die Kohlensäure bei den Keimungsvorgängen unter Stickstoff laufend aus den Gefäßen gespült wird. Der p_H-Wert des zur Quellung verwendeten Wassers sank im Verlauf von 72 Std von etwa 7 auf 6.

Die Kontrollversuche zur „Stickstoffbehandlung“ erfolgten in Exsikkatoren, die mit der gleichen Geschwindigkeit luftdurchströmt waren, und zeigten den auch für Petrischalen-Kontrollen charakteristischen niedrigen Prozentsatz von cytologischen Aberrationen im Wurzelspitzenmeristem. Auf die Möglichkeit, daß die Anaerobiose für die mit der Samenvorquellung verbundenen Effekte verantwortlich zu machen ist, wiesen zuerst LEVAN und LOTFY (1950) hin, die mit 24 Std vorgequollenem Material arbeiteten. Ihre Vorstellungen dürften durch unsere Untersuchungen voll bestätigt worden sein.

Auch für eine Reihe zoologischer Objekte sind nach BRACHET (1957) tiefgreifende, mit der Anaerobiose verbundene Abnormitäten nachgewiesen worden. So wurden bei den untersuchten Objekten die Furchungsteilungen \pm schnell blockiert. Daneben wurden cytologische Abnormitäten, wie Degenerationen der Chromosomen und des Spindelapparates, nachgewiesen. Gleiche Wirkungen wie durch die Anaerobiose wurden nach Einwirkung von Cytochromoxydase-Inhibitoren (Cyaniden, Carbonmonoxyd, Natriumazid) erhalten. Auch Gewebekulturzellen stellten bei Vorliegen anaerober Bedingungen ihr Wachstum schnell ein.

¹ Anmerkung bei der Korrektur: In der Zwischenzeit durchgeführte Versuche mit belüftetem, stehendem Wasser, mit fließendem Wasser und unter sterilen Bedingungen in stehendem Wasser lassen keine Zweifel an dieser Deutung bestehen.

Die Keimungsversuche unter Ausschluß von O_2 (in Gegenwart von reinem Stickstoff), die im Gegensatz zur Samenquellung unter Wasser eine wesentlich verfeinerte und exaktere Versuchseinstellung erlauben, werden gegenwärtig in größerem Umfange durchgeführt und erfahren eine genaue cytologische Auswertung auf chromosomale Aberrationen. Parallel dazu erfolgen biochemische Analysen der durch die Anaerobiose bedingten stoffwechselphysiologischen Veränderungen, die zur Herabsetzung der chromosomalen Stabilität führen¹.

Der cytologische Effekt der Anaerobiose könnte objektgebunden sein und evtl. von den jeweiligen Reservestoffen der Samen abhängen, da die gleiche Behandlung nach vorläufigen Ergebnissen bei der Gerste erfolglos ist und nur von einer bestimmten Grenze an die Keimfähigkeit der Samen aufhebt. Für den *Vicia*-Fall drängt sich daraus die Vermutung auf, daß die mit der Anaerobiose verbundenen Effekte bedingt sind durch die Induktion oder Akkumulation automutagen wirksamer Substanzen oder Zustände, die unter dem Einfluß bestimmter, von außen einwirkender Bedingungen in spezifischer Abhängigkeit vom jeweiligen Objekt entstehen, da gleiche Behandlung nicht bei allen Objekten zu gleichen Wirkungen führt.

Die nach der Quellung der Samen unter Wasser und als Folge der Stickstoffatmosphäre erhaltenen Ergebnisse dürften deshalb von Interesse sein, weil sie unter Umständen eine der möglichen Ursachen der spontanen Mutabilität aufdecken, da zumindest mit begrenzten Zeiträumen von partieller Anaerobiose auch unter natürlichen Verhältnissen gerechnet werden kann. Es sind heute bereits eine ganze Reihe von spezifischen, sicherlich mit stoffwechselphysiologischen Veränderungen gekoppelte Zustände bekannt, mit denen eine zum Teil sehr starke Erhöhung der spontanen Mutabilität verbunden ist. So führt unter anderem Zell- (CARTELEDGE, MURRAY und BLAKESLEE 1935) und Samenalterung zur Erhöhung der normalen Mutations- und Aberrationsrate bei verschiedenen Objekten [*Crepis* (NAWASCHIN 1933); *Antirrhinum* (STUBBE 1935); Mais (PETO 1933); *Datura* (CARTELEDGE und BLAKESLEE 1934); *Triticum*, *Secale* und *Hordeum* (SCHKWARNIKOW 1937) u. a.]. Darüber hinaus hat sich in den letzten 15 Jahren die Kenntnis von Substanzen, die unter natürlichen Bedingungen in den Organismen auftreten können und mutagen wirken, stark vermehrt. Derartige „automutagene Substanzen“ treten dabei nicht nur in den Samen, sondern auch in anderen Pflanzenteilen auf, und wäßrige Extrakte aus diesen Teilen können eine unter Umständen erhebliche mutagene Wirkung ausüben (KECK und HOFFMANN-OSTENHOF 1951). Weiterhin konnte MARQUARDT (1949) die mutagene, aber nicht automutagene Wirkung wäß-

¹ Sie werden gemeinsam mit K. RAMSHORN (Chemisch-Physiologische Abteilung unseres Institutes) durchgeführt.

riger Extrakte gealterter, nicht mehr keimfähiger Samen von *Oenothera* nachweisen. Für eine ausführliche zusammenfassende Darstellung zum Problemkreis der Bedingungen zwischen Stoffwechsel und spontaner Mutabilität der Pflanzen sei auf d'AMATO und HOFFMANN-OSTENHOF (1956) verwiesen.

Die Wirkung von Zell- und Samenalterung einerseits und von Anaerobiose andererseits dürften zwei verschiedene Aspekte der vielfältigen Induktionsmöglichkeiten von stoffwechselphysiologischen Fehlleistungen sein, die über die Entstehung automutagener Substanzen die spontane Mutabilität erhöhen.

Summary

Seeds of *Vicia faba* L. var. *minor* ($2n = 12$) were submerged in tap water for 12 to 96 hours. After submersion and recovery times of 48 to 144 hours root tips were fixed in intervals of 24 hours. The presoaking of seeds before germination led to an increase of the spontaneous chromosomal aberration rate. Up to 65% of all cells in the root tips showed fragments, chromatid-translocations and triradials after 72 hours of presoaking and up to 12% of all chromosomes showed breaks or participated in chromatidial reunions. Submersion of seeds for 12 hours already caused a statistically significant increase of chromosomal aberrations in comparison to the controls. The maximum of aberrations was found after a recovery period of 120 hours, afterwards the aberration rate dropped.

Parallel experiments with the N_2 -atmosphere showed that the increase in aberration rate is caused by metabolic changes produced by anaerobiosis. Probably the changed metabolic conditions led to the formation of automutagenic substances. The distribution of breaks between the m- and SAT-chromosomes was not at random (theoretical expectation 5:2); more breaks appeared in the m- than in the SAT-chromosomes (actual relation 5:1,1). The breaks in the m- and SAT-chromosomes were localized in a few special regions.

Literatur

- BRACHET, I.: Biochemical cytology. New York: Academic Press 1957. — CARTELEDGE, I. L., and A. F. BLAKESLEE: Mutation rate from old *Datura* seeds as shown by pollen abortion. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 20, 103—110 (1934). — Mutation rate from old *Datura* seed. Science 81, 492—493 (1935). — CARTELEDGE, I. L., M. I. MURRAY and A. F. BLAKESLEE: Increased mutation rate from aged *Datura* pollen. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 21, 597—600 (1935). — CONGER, A. D., and L. M. FAIRCHILD: A quick-freeze method for making smear slides permanent. Stain Technol. 28, 281—283 (1953). — D'AMATO, F., and O. HOFFMANN-OSTENHOF: Metabolism and spontaneous mutations in plants. Adv. in Genet. 8, 1—28 (1956). — DEUFEL, I.: Untersuchungen über den Einfluß von

Chemikalien und Röntgenstrahlen auf die Mitose von *Vicia faba*. Chromosoma 4, 239—272 (1951). — FORD, C. E.: Chromosome breakage in nitrogen mustard treated *Vicia faba* root tip cells. Proc. 8. Internat. Congr. Genetics. Hereditas (Lund) Suppl., 570—571 (1948). — GLÄSS, E.: Untersuchungen über die Einwirkung von Schwermetallsalzen auf die Wurzelspitzenmitose von *Vicia faba*. Z. Bot. 43, 359—403 (1955); 44, 1—58 (1956). — Die Verteilung von Fragmentationen und achromatischen Stellen auf den Chromosomen von *Vicia faba* nach Behandlung mit Schwermetallsalzen. Chromosoma 8, 260—284 (1956). — KECK, K., und O. HOFFMANN-OSTENHOF: Pflanzliche Stoffwechselprodukte als Mitosegifte. I. Mitosehemmende und -störende Substanzen in wäßrigen Auszügen aus *Allium cepa* (Speisezwiebel). Mh. Chem. 82, 559—562 (1951). — Chromosome fragmentation in *Allium cepa* induced by seed extracts of *Phaseolus vulgaris*. Caryologia (Pisa) 4, 289—294 (1951). — KIHLMANN, B., and A. LEVAN: Localized chromosome breakage in *Vicia faba*. Hereditas (Lund) 37, 382—388 (1951). — LA COUR, C. F.: Heterochromatin and the organization of nucleoli in plants. Heredity 5, 37—50 (1951). — The physiology of chromosome breakage and reunion in *Hyacinthus*. Heredity 6, (Suppl.) 163—180 (1953). — LEVAN, A., and TH. LOTFY: Spontaneous chromosome fragmentation in seedlings of *Vicia faba*. Hereditas (Lund) 36, 470—482 (1950). — MARQUARDT, H.: Mutationsauslösung durch Putrescin-Hydrochlorid und Kalteextrakt aus überalterten *Oenothera*-Samen, Experientia (Basel) 5, 401—403 (1949). — NAWASCHIN, M.: Altern der Samen als Ursache von Chromosomenmutationen. Planta (Berl.) 20, 233—243 (1933). — OEHLKERS, F.: Chromosome breaks influenced by chemicals. Heredity 6, Suppl., 95—105 (1953). — PETO, F. H.: The effect of ageing and heat on the chromosome mutation rates in maize and barley. Canad. J. Res., C 9, 261—264 (1933). — REVELL, S. H.: Chromosome breakage by X-rays and radiomimetic substances in *Vicia*. Heredity 6, Suppl., 106—124 (1935). — SCHKWARNIKOW, P. K.: Über Erhöhung der Mutationsrate bei Weizen nach langer Aufbewahrung der Samen. Genetica 19, 188—199 (1937). — STUBBE, H.: Samenalter und Genmutabilität bei *Antirrhinum majus* L. nebst einigen Betrachtungen über den Zeitpunkt des Mutierens während der Entwicklung. Biol. Zbl. 55, 209—215 (1935). — WOLL, E.: Einwirkung von Nukleinsäuren und ihren Bausteinen auf die Wurzelspitzenmitose. Chromosoma 5, 391—427 (1953).

Dr. RIGOMAR RIEGER u. Dipl. agr. ARND MICHAELIS,
Institut für Kulturpflanzenforschung, Gatersleben Krs. Aschersleben

Aus der Zweigstelle Rosenhof des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung,
Ladenburg bei Heidelberg

ZUR KARYOLOGIE DER MEIOSE DES LEBERMOOSES SPHAEROCARPUS DONNELLII*

Von

ALOIS REITBERGER und ERIKA BUCHNER

Mit 15 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Februar 1958)

Im Zusammenhang mit den tetradenanalytischen Untersuchungen an *Sphaerocarpus donnellii*, die von KNAPP (1935, 1936, 1937) sowie von KNAPP und MÖLLER (1955) durchgeführt wurden und noch weiter im Gange sind, ist eine genaue Kenntnis der Meiose dieses Lebermooses von Interesse. Zwar hat sich schon LORBEER (1934) mit ihr befaßt; aber seine Ergebnisse sind lückenhaft, und einige eigenartige Angaben von ihm über bestimmte Meiosestadien bedurften einer Nachprüfung. In vorliegender Arbeit wird über die Meiose vom Pachytän bis zur Metaphase I berichtet.

Die untersuchten Pflanzen gehörten sämtlich zur Standardlinie 4. Sie wurden auf 1,6%igem „Benecke-Agar“ oder auf Erde in mit Leuchtstoffröhren beleuchteten Thermostaten herangezogen, in denen eine Dauertemperatur von 18° C oder eine Wechseltemperatur von 22° C tagsüber und 6° während der Nacht herrschte. 25 bis 30 Tage nach Zugabe von Spermatozoiden auf die ♀♀ enthielten die Sporangone Meiosestadien.

Fixiert wurde mit Alkohol-Eisessig (3:1 oder 2:1), Carnoy (6 Teile 96%iges Äthanol, 1 Teil Eisessig, 3 Teile Chloroform) und Bouin-Allen (BA) bei Zimmertemperatur. (Mit La Cour 2 BE und Nawaschin fixierte Präparate waren schlecht.) Gefärbt wurde in Karminessigsäure, nach Feulgen mit und ohne Lichtgrün-Gegenfärbung, mit Heidenhains Hämatoxylin, schließlich mit Methylgrün-Pyronin (und Mayers Hämalaun mit und ohne Eosin-Gegenfärbung).

Feulgen-Quetschpräparate von Sporenmutterzellen befriedigten nicht; ferner war bei diesen die Alkoholeisessig-Karminessigsäure-Quetschmethode nur beschränkt brauchbar, weil sich nach ihr (bei der angewandten speziellen Technik) das Chromatin und die Nucleolen in nicht unterscheidbarer Weise anfärbten und weil die Lage der Zellkernstrukturen (z. B. der beiden Bivalentpartner) erhalten bleiben mußte, was bei der Quetschmethode nicht unbedingt gewährleistet ist. Darum wurden fast nur Mikrotomschnitte ausgewertet; es handelt sich dabei um 10 μ dicke, mittels des Kryostaten¹, System Dittes-Duspiva, hergestellte Gefrierschnitte (von fixierten Sporangonen), die wohl die besten Präparate lieferten, sowie vor allem um 8–15 μ dicke Paraffinschnitte. Die Abb. 1 und 18 sind aus Gefrierschnitten, die übrigen aus Paraffinschnitten gezeichnet.

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

¹ Dieser ist eine Kühlkammer (105×70×132 cm), in der eine Temperatur bis –27° C erreicht werden kann und sich das von außen anzutreibende Serienschneid-Mikrotom nach Minot befindet. Eine Vorrichtung an diesem verhindert ein Aufrollen der Schnitte.

Befunde

Die diplophasische Mitose von *Sph. donnellii* zeigt 14 Autosomen (darunter ein Satellitenchromosomenpaar), die wohl alle einen medianen oder submedianen Kinetochor besitzen, sowie 2 Geschlechtschromosomen, nämlich das punktförmige Y und das fast gleichschenklige X, das beträchtlich länger als jedes Autosom ist (LORBEER 1934).

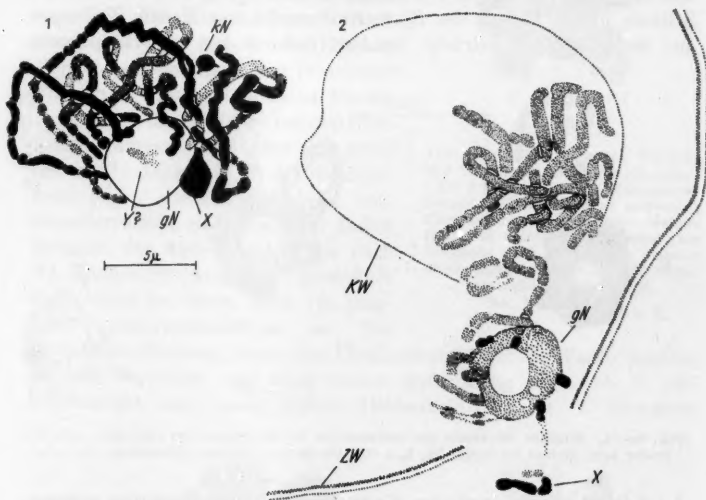


Abb. 1 u. 2. Pachytän. 1. *gN*, *kN* großer bzw. kleiner Nucleolus; X, Y X- bzw. Y-Chromosom. Es wurden einige unbedeutende Verschiebungen vorgenommen. BA, Heidenhain, 10 μ . 2. Der große Nucleolus (*gN*) und das X-Chromosom o(X) sind beim Mikrotomschneiden auf den Zellkern gedrückt worden; trotzdem sind Endstücke von Bivalenten mit dem Nucleolus in Verbindung geblieben. Siehe Text! KW Kernwand, ZW Zellwand. BA, Feulgen, 12 μ .

Im mittleren Pachytän (Abb. 1) lassen sich 7 autosomale Bivalente zählen; eines von ihnen zeigt an einer Stelle (bei *kN*) seine Zusammensetzung aus zwei Partnern. Das X ist während des Pachytäns im Vergleich zu den Bivalenten stark kondensiert; es verharrt in diesem Zustand bis zur Anaphase I und bleibt bis dahin nach Feulgen kräftig färbbar. Die beiden Geschlechtschromosomen zeigen mindestens vom mittleren Pachytän ab Distanzkonjugation (Abb. 3a, 5, 6, 14, 15) und werden, wie die Anaphasen I erweisen, ausnahmslos präreduziert, was beides auch LORBEER (1934) gefunden hat.

Im Pachytän sind X und Y einem ungewöhnlich großen, Feulgen-negativen Nucleolus angelagert, der inhomogen ist, häufig eine höckerige Oberfläche hat und stets exzentrisch im Kern liegt (*gN* in Abb. 1;

vgl. dazu Abb. 3a, 3b, 3d, 4, 5). Gegen ihn sind auch die Enden der 7 Bivalente ausgerichtet (davon macht in Abb. 1 nur das bei *kN* befindliche Bivalent eine Ausnahme). Im Pachytän (und Diplotän) sind wohl sämtliche Bivalente an je einem Ende mit dem Nucleolus verbunden (Abb. 3a; rechtes Bivalent in 3b; 3c; 3d). Daß dabei nicht bloß eine lose Berührung, sondern ein fester Zusammenhalt vorliegt, zeigt Abb. 2. Hier ist der Nucleolus beim Mikrotomschneiden aus den Zellkern in das Plasma der Sporenmutterzelle (das X zum Teil sogar aus dieser heraus) gedrückt worden; dadurch hat die Hauptmasse

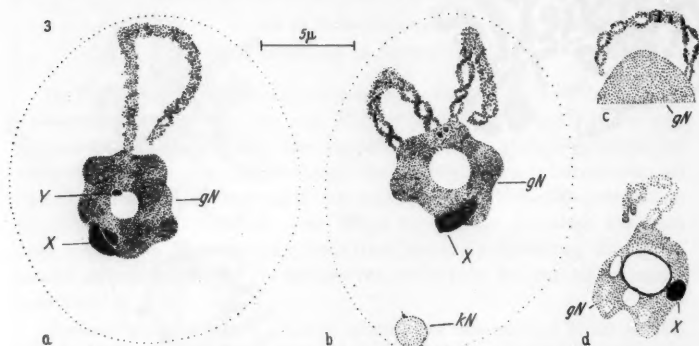


Abb. 3a—d. Einzelne Bivalente im beginnenden (a) bis späten (d) Diplotän. *gN*, *kN* großer bzw. kleiner Nucleolus. a, b, c BA, Feulgen; d Carnoy, Heidenhain; 8—15 μ

der 7 Bivalente die vorherige Verbindung mit dem Nucleolus verloren, aber es hängen an diesem noch immer 7 Endstücke von Bivalenten. — Manchmal beobachtet man in einiger Entfernung von dem großen Nucleolus bei den Bivalenten einen weiteren, viel kleineren, kugelförmigen, Feulgen-negativen Nucleolus (*kN* in Abb. 1; vgl. auch *kN* in 3b); auf seiner Oberfläche können 2 dornförmige Strukturen zu sehen sein.

Im Diplotän verkürzen sich die Bivalente, und der Zusammenhalt ihrer beiden Partner lockert sich, wobei keine Chromatiden sichtbar werden und mehrere Paarungsstellen verbleiben (Abb. 3b—d); wie weit diese Chiasmen darstellen, ist nicht geklärt. Nach weiterer Verkürzung sitzen die nach Feulgen schwach färbbaren Bivalente (sowie das X und das Y) in charakteristischer Weise dem großen Nucleolus auf (Abb. 4).

Dieser nimmt in der nun folgenden frühen und mittleren Diakinese an Volumen ab und kann dabei in mehrere Teile zerfallen (N_1 , N_2 , N_3 in Abb. 6). Im Kern der Abb. 5 sind außer dem gelblich gefärbten

großen Nucleolus (gN) noch 2 ungefärbte kleine Nucleolen vorhanden (kN_1 , kN_2). Von ihnen weist einer (kN_1) auf seiner Oberfläche ein dornförmiges Gebilde auf. Er (und auch der andere?) ist wohl von der Art des kleinen Nucleolus in Abb. 1 und 3b (kN).

An den Bivalenten im Stadium der Abb. 4 sieht man gelegentlich Feulgen-negative „Eliminationskörper“ (Bivalent 1 bis 4 in Abb. 4; die Eliminationskörper sind hier und in anderen unserer Abbildungen in heller Tönung gezeichnet), die zweifellos von den Bivalenten stammen. Deutlicher sind sie in der frühen Diakinese, in der die Bivalente gegen die Kernperipherie auseinanderdrücken, zu beobachten. Jedem Bivalent der Abb. 5 und 6, die nach BA-Feulgen-Präparaten gezeichnet sind, hängt an einem Ende ein länglicher Eliminationskörper an. Bei Heidenhain-Färbung geben die Eliminationskörper die Farbe leichter als die Bivalente und nicht immer gleichmäßig ab. Abb. 7 veranschaulicht aus einem Carnoy-Heidenhain-Präparat 2 Bivalente



Abb. 4. Stadium zwischen Diplotän und Diakinese. gN großer Nucleolus; 1 bis 4 Bivalente mit Eliminationskörpern, 5 Bivalent ohne sichtbaren Eliminationskörper, zwei weitere Bivalente wurden weggelassen. Die Bivalente sind hier und in anderen Abbildungen dunkler als ihre Eliminationskörper gezeichnet. BA, Feulgen, 13 μ

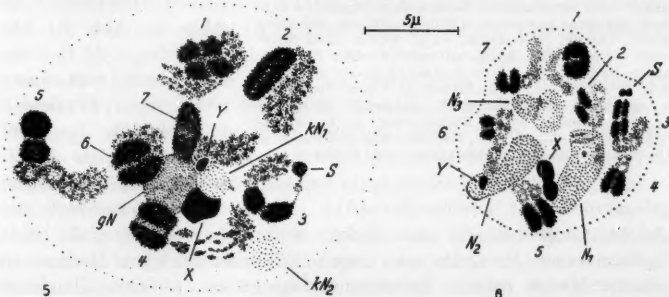


Abb. 5 u. 6. Frühe bis mittlere Diakinese. gN großer Nucleolus; kN_1 , kN_2 kleine Nucleolen; N_1 , N_2 , N_3 Zerfallsteile des großen Nucleolus; S Satellit; 1 bis 7 Bivalente mit Eliminationskörpern. BA, Feulgen, 14 bzw. 12 μ

einer Sporenmutterzelle, in der alle 7 Bivalente je einen Eliminationskörper erkennen ließen, der schwächer als die 7 Bivalente gefärbt war. Nach Heidenhain-Rückfärbung von Feulgen-gefärbten Bivalenten (Abb. 8a₁, 8b₁, 8c₁) ist ein Eliminationskörper bald in seiner ganzen Ausdehnung kaum stärker als der Untergrund gefärbt, bald zum einen

Teil schwarz wie das Bivalent und zum übrigen Teil etwas intensiver als der Untergrund (Abb. 8a₂), bald schwarz und dunkelgrau (Abb. 8b₂); schließlich kommt es vor, daß ein Eliminationskörper erst nach Heidenhain-Rückfärbung auffällt oder sichtbar wird (vgl. Abb. 8c₁ mit 8c₂). Auch das umgekehrte Färbeverfahren wurde angewandt (vgl. Abb. 9a₁, 9b₁ und 9c₁ mit 9a₂ bzw. 9b₂ und 9c₂). Ein Bivalent kann

nach Heidenhain-Färbung scheinbar dicker als nach Feulgen-Färbung sein, wenn es im optischen Schnitt allseitig vom Eliminationskörper umgeben ist (vgl. Abb. 9c₁ mit 9c₂; man vergleiche in diesem Zusammenhang auch Abb. 8b₂ mit 8b₁).

Die Eliminationskörper besitzen oft eine verschieden nahe bis zum Bivalent heranreichende Trennungslücke (Bivalent 2 in Abb. 4; Bivalent 1 in Abb. 5; Abb. 7, 8b, 8c₂, 9a₂, 12 f), die sehr breit sein kann (Abb. 9c₂; Bivalent 5 in Abb. 15). Die zwei Spaltstücke des Eliminationskörpers spreizen

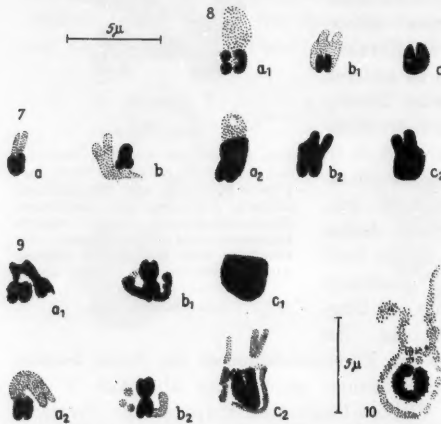


Abb. 7—10. Bivalente mit Eliminationskörpern. 7 a u. b. Zwei Bivalente aus einem in früher Diakinese stehenden Kern. Carnoy, Heidenhain, 12 μ. 8a—c. Drei Bivalente. Obere Reihe (a₁, b₁, c₁): nach Feulgen-Färbung; untere Reihe (a₂, b₂, c₂): nach Heidenhain-Rückfärbung. BA, 14 μ. 9a—c. Drei Bivalente. Obere Reihe (a₁, b₁, c₁): nach Heidenhain-Färbung; untere Reihe (a₂, b₂, c₂): nach Feulgen-Rückfärbung. a, b Carnoy; c, Alkohol-Eisessig (3:1), c₂ Nachfixierung mit BA. 10 μ. 10. Bivalent mit Eliminationskörper. BA, Feulgen, 14 μ.

gelegentlich weit auseinander (Abb. 10, 9b). Beide haben stets die gleiche Länge, Breite und Dicke, woraus hervorgeht, daß beide Partner eines Bivalents zu dessen Eliminationskörper Material in gleicher Menge liefern. Unbekannt dagegen ist, ob eine Gleichheit in der Menge des Eliminationsmaterials auch von Bivalent zu Bivalent und von Sporenmutterzelle zu Sporenmutterzelle besteht. Der Satellit weist einen eigenen, kleinen, kugelförmigen Eliminationskörper auf (Abb. 5, unterhalb von S); dieser kommt zwischen ihm und dem Hauptteil des Bivalents zu liegen, während letzterer seinen Eliminationskörper an seinem dem Satelliten abgewandten Ende anhängen hat (vgl. auch Bivalent 3 in Abb. 6). Ob auch bei den anderen Bivalenten der Eliminationskörper stets einem bestimmten

Bivalentende anhängt, ist nicht geklärt. Wie die Abb. 8b₁, 9c₂, 10 und 12f erweisen, bildet der Eliminationskörper zunächst eine Hülle um das Bivalent. In der späten Diakinese verfällt er der Auflösung (Abb. 13), deren Beginn man wohl bei Bivalent 4 in Abb. 5 vor sich hat.

Auffällig ist die Morphologie der Bivalente. Häufig zeigen sie einen, nie zwei Längsspalte. Das Satellitenbivalent besitzt zwei Einschnürungen; die eine, die sich nahe an einem Ende befindet und sehr breit sein kann, trennt den köpfchenförmigen Satelliten vom Hauptteil des Bivalents ab, die andere, die submedian liegt, entspricht dem Kinetochor (Bivalent 3, 3 und 2 in Abb. 5 bzw. 6 und 15). Soweit bei den anderen Bivalenten eine Einschnürung zu sehen ist, entspricht sie zweifellos



Abb. 11 und 12a—f. Bivalententwicklung in der mittleren Diakinese. Bei einigen Bivalenten (11, Mitte; 12b; 12e; 12f) ist ein Eliminationskörper zu sehen. 11, 12b—e Carnoy, Heidenhain, 12 μ ; 12a Carnoy, Feulgen-Lichtgrün, 15 μ ; 12f BA, Feulgen, 14 μ

ebenfalls dem Kinetochor (Bivalent 1 in Abb. 5; Abb. 8a₁, 9b, 12a, 12c—e). Bei zahlreichen Bivalenten berühren sich die beiden Homologen an keiner Stelle; bald liegen sie dabei nebeneinander, und zwar parallel zueinander (z.B. Bivalent 4 in Abb. 5, 3 bis 5 in Abb. 6, 1 und 4 in Abb. 15) oder an einem (Abb. 12a) oder an beiden Enden einander genähert (Abb. 12b), bald liegen sie hintereinander (Abb. 12c—e). Andererseits können zwei Homologe stellenweise in unmittelbarem Kontakt miteinander stehen (z.B. Bivalent 7 in Abb. 6; Abb. 8c₁; Abb. 9c₂); ob hierbei Chiasmen vorliegen, bleibt offen. Es treten Bivalente auf, deren Homologe beträchtlich weit voneinander entfernt und durch einen Eliminationskörper miteinander verbunden sind (mittleres Bivalent in Abb. 11; Abb. 12e und f).

In der späten Diakinese (Abb. 13) lassen die Bivalente ihre bisherige Zusammensetzung aus zwei Homologen meist nicht mehr unmittelbar erkennen; in Abb. 13 z.B. zeigt nur mehr ein einziges Bivalent (halb-links oben) einen Längsspalt. Die Nucleolen und Eliminationskörper zerfallen nun vollständig. Schließlich beginnen die Spindelfasern zu erscheinen.

Während der Metaphase I (Abb. 14) sind zwischen den beiden Spindelpolen keine Reste von Nucleolen und Eliminationskörpern mehr sichtbar. Die Bivalente färben sich nach Feulgen jetzt ebenso stark wie das X. Ihre beiden Homologen zeigen unmittelbaren, terminalen Kontakt miteinander.

In dem in früher bis mittlerer Diakinese stehenden, aus einem BA-Feulgen-Präparat stammenden Kern der Abb. 15 ist anstelle des großen Nucleolus eine Anzahl kleinerer, gelblich gefärbter Nucleolen verschiedener Größe vorhanden.

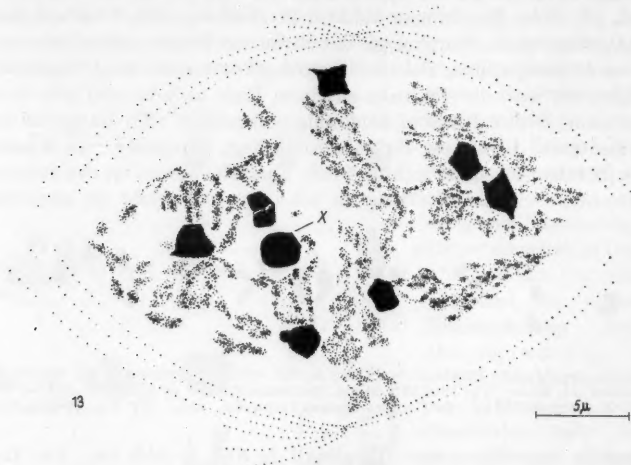


Abb. 13. Späte Diakinese. Die sieben Bivalente und das X-Chromosom (X) sind von den (hellgetönten) Zerfallteilen der Eliminationskörper und des großen Nucleolus umgeben. BA, Feulgen, 12 μ

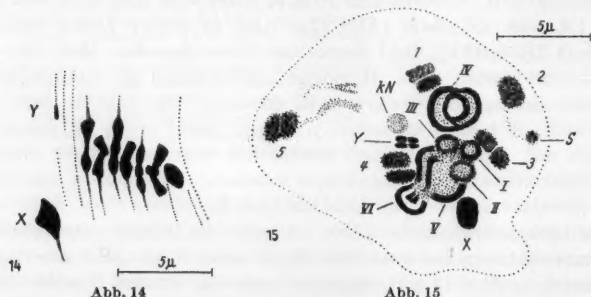


Abb. 14. Metaphase I in Seitenansicht. BA, Feulgen, 10 μ

Abb. 15. Frühe bis mittlere Diakinese. *kN* kleiner Nucleolus; *S* Satellit; *Y* das in zwei Chromatiden längsgestellte Y-Chromosom; *I* bis *IV* Bivalente ohne sichtbare Eliminationskörper, *V* Bivalent mit sichtbarem Eliminationskörper, zwei weitere Bivalente wurden weggelassen; *I* bis *VI* „Fadennucleolen“, weitere solche noch vorhandene wurden nicht eingezeichnet. Siehe Text! BA, Feulgen, 12 μ

Sie erscheinen im optischen Querschnitt von einem dicken, Feulgen-negativen Faden begrenzt, der ziemlich (*I, II, III* in Abb. 15) bis ausnehmend scharf (*IV, V, VI*) hervortritt. Solche Nucleolen wurden von uns des öfteren beobachtet. Ihre Fäden, die vielleicht auf eine Phasentrennung der Nucleolarsubstanz zu-

rückzuführen sind, sind im Feulgen-Präparat dunkelbraun, im Carnoy-Heidenhain-Präparat hellgrau bis schwarz. Es können auch zueinander parallele Fäden zu sehen sein (IV, V, VI). LORBEER (1934) betrachtete die Fäden als Autosomen (seine Fig. 29), zwei zueinander parallele Fäden als sich paarende Homologe bzw. homologe Chromosomenabschnitte, und glaubte demgemäß Kerne des „Pachytän-Zygotäns“ vor sich zu haben. Daß er sich irrte, geht auch daraus hervor, daß in solchen Kernen Feulgen-positive Bivalente nachzuweisen sind (Bivalent 1 bis 5 in Abb. 15).

Besprechung

Der im Pachytän und Diplotän bei *Sph. donnellii* vorhandene große Nucleolus zeichnet sich dadurch aus, daß die Enden der Bivalente gegen ihn ausgerichtet sind und jedes Bivalent an einem Ende in fester Verbindung mit ihm steht. Wenn auch LORBEER (1934) nichts davon im Text erwähnt, so sieht man doch in seiner Figur 27, die nach ihm ein Leptotän wiedergibt, daß fast sämtliche Chromosomenenden gegen einen sehr großen, exzentrischen Nucleolus ausgerichtet sind. Entsprechende Verhältnisse scheinen bei den Milben *Pediculopsis graminum* (COOPER 1939) und *Pediculoides ventricosus* (PÄTAU 1936) zu bestehen.

Eliminationskörper sind bisher noch nicht bei Pflanzen, dagegen bei Tieren beschrieben worden; sie kommen hier vor bei den ♀♀ von Schmetterlingen (SEILER 1914, 1923, und andere Autoren), Trichopteren (KLINGSTEDT 1931) und der Milbe *P. graminum* (COOPER 1939, hier Literatur). Während bei *Sph. donnellii* die Eliminationskörper schon in der Prophase (der Meiose) auftreten, erscheinen sie dort erst in der Anaphase (der ersten, bei *P. graminum* dazu der zweiten Reifeteilung und darauf folgender Furchungsmiösen); nur beim ♂ der Trichoptere *Limnophilus decipiens* bilden sie sich nach KLINGSTEDT anscheinend zum gleichen Zeitpunkt wie bei *Sph. donnellii*. Sonst jedoch ergeben sich enge Parallelen: Bei *Sph. donnellii* wie auch bei den tierischen Objekten sind die Eliminationskörper Feulgen-negativ (z. B. BAUER 1933), geben bei Heidenhain-Färbung die Farbe leicht ab, besitzen Chromosomenform und bilden anfänglich eine Hülle um die Chromosomen (FOGG 1930, SCHÄFFER 1944); schließlich kommt jedem Partner eines Bivalents bzw. jeder mitotischen Geschwisterchromatide (COOPER 1939, seine Fig. 77, 79, 96) ein eigener, gleich großer Eliminationskörper zu, der bald der Auflösung verfällt.

Bei der Zikade *Aphrophora salicina* (ILLERT 1956) sowie bei den Milben *Gamasus brevicornis* und *G. magnus* (SOKOLOV 1934, seine Abb. 20 und 97) sind in bestimmten Stadien der Spermatogenese die Chromosomen in einem schwächer als sie färbbaren Material eingebettet, das nach unserer Deutung Eliminationskörpern entspricht. Mit den Eliminationskörpern sind nach RIS und KLEINFELD (1953) auch die „Interzonalverbindungen“ (Literatur bei SCHRADER 1954) wesensgleich; sie treten in vielen Zellen, besonders bei Hemipteren und Homopteren, in der Anaphase zwischen den an die Pole wandernden Hälften jedes Chro-

mosoms auf und sind nach verschiedenen Autoren eine zähe Hülle des Chromosoms, die schleimartig zwischen dessen zu den Spindelpolen auseinanderweichenden Hälften ausgezogen wird. Diese Hülle ist nach SCHRAEDER (1954) die Pellicula oder Scheide der Chromosomen.

Die Eliminationskörper bestehen, nach den Befunden von RIS und KLEINFELD (1953) bei dem Schmetterling *Solenobia*, im wesentlichen aus Ribosenucleoproteiden. Solche werden nach JACOBSON und WEBB (1951, 1952) auch bei tierischen Gewebekulturzellen von den Anaphasechromosomen abgeschieden. Nach allem dürfte die Abgabe von Ribosenucleoproteiden von den Chromosomen gegen Ende der Kernteilung eine verbreitete, wenn nicht allgemeine Erscheinung sein und die Bildung der Eliminationskörper einen Spezialfall dieser allgemeinen Erscheinung darstellen, bei dem es sich um eine besonders auffällige Substanzabgabe handelt. Eine irgendwie geartete Materialabgabe von den Bivalenten ist bei *Sph. donnellii* in Anbetracht der starken Volumenabnahme, die hier die Bivalente zwischen dem mittleren Pachytän (Abb. 1) und der mittleren Diakinese (Abb. 11) aufweisen, von vornherein zu erwarten.

Das Material für die Eliminationskörper erhalten die Chromosomen wahrscheinlich auf irgendeine Weise von den Nucleolen. Dafür spricht, daß alle Objekte mit Eliminationskörpern ungewöhnlich viel Nucleolarsubstanz (zum Teil in Form eines sehr großen, inhomogenen Nucleolus) aufweisen, daß ferner mindestens bei *Sph. donnellii* und *P. graminum* eine enge räumliche Beziehung zwischen den Bivalenten und dem Nucleolus besteht und schließlich, daß allgemein die Nucleolen und, wohl ebenfalls allgemein, die Eliminationskörper sich beide weitgehend aus Ribosenucleinsäure und Eiweißen zusammensetzen. Auch nach KAWAGUCHI (1928) stammt das Eliminationsmaterial bei dem Schmetterling *Bombyx* wahrscheinlich von den Nucleolen. Daß übrigens generell Nucleolarsubstanz auf die Chromosomen übergeht, wurde schon öfters von älteren Autoren und neuerdings von JACOBSON und WEBB (1951, 1952) behauptet. Wird allgemein die von den Chromosomen abgegebene Substanz von den Nucleolen geliefert, dann muß man bei besonders reichlicher Substanzabgabe, wie dies offenbar bei der Absonderung von Eliminationskörpern der Fall ist, auch eine besonders reichliche Menge von Nucleolarsubstanz erwarten, was ja tatsächlich für die Arten mit Eliminationskörpern auch zutrifft.

Obwohl LORBEER (1934) nichts von Eliminationskörpern bei *Sph. donnellii* schreibt, hat er sie nach unserer Deutung in seiner Fig. 30 doch gezeichnet, und zwar als den Bivalenten anhängende, etwas heller als diese getönte Körper. In diesem Zusammenhang ist zu vermerken, daß LORBEER zum Studium der Diakinese wahrscheinlich ausschließlich in Karminessigsäure färbte, wobei nach ihm die Autosomen und Nucleolen „denselben Grad der Färbung“ annahmen.

Man könnte bei *Sph. donnellii* die „Eliminationskörper“ und die dazu gehörenden „Bivalente“ vielleicht für zwei sich verschieden färbende Bivalentab-

schnitte halten. Dagegen spricht, daß bei diesem Lebermoos weder in der Mitose (LORBEER 1934) noch in der Meiose vor der Diakinese färberisch sich verschieden verhaltende Chromosomenabschnitte beobachtet wurden, abgesehen wohl von einigen sehr kleinen, positiv-heterochromatischen Endstücken von Bivalenten (und dem total-heterochromatischen X und Y); ferner wurde hier die Auflösung der Eliminationskörper gesehen.

Da von KNAPP und Mitarbeitern bei *Sph. donnellii* ein Faktorenaustausch zwischen zwei der vier Chromatiden nachgewiesen ist, sind hier nach der herrschenden Auffassung Chiasmen zu erwarten. Ob solche im Diplotän bei *Sph. donnellii* auftreten, ist unklar. Sicher ist, daß in der Diakinese Bivalente vorkommen, bei denen kein unmittelbarer Kontakt zwischen den beiden Partnern zu beobachten ist. Man könnte hier unsichtbare Chiasmen postulieren. Zwangloser jedoch ist es, hier ein tatsächliches Fehlen von Chiasmen anzunehmen; in diesem Falle wären die Chiasmen geöffnet oder gar keine angelegt worden und die Endbindungen in der Metaphase I wahrscheinlich achiasmatisch.

Die beiden Partner der Bivalente der mittleren Diakinese sind bei *Sph. donnellii* wohl stets durch einen Eliminationskörper miteinander verbunden. Nun besitzen die Bivalente bei allen Objekten, bei denen Eliminationskörper vorkommen, während eines Teils oder des ganzen Verlaufs der Meiose keine Chiasmen (bei *Gamasus*, bei dem wahrscheinlich Eliminationskörper auftreten, kommt es in der Diakinese zu einer völligen Isolierung sogar aller vier Chromatiden). Dies sowie die Beobachtung, daß der Eliminationskörper zunächst eine Hülle um das Bivalent bildet, sprechen dafür, daß allgemein der Eliminationskörper anstelle von Chiasmen das Bivalent in der späten Prophase oder sogar noch in der Metaphase I zusammenhält. Dabei sind zusätzlich zum Eliminationskörper oder abwechselnd mit diesem noch andere Zusammenhaltemechanismen wirksam.

Zusammenfassung

Es wurde die Meiose des Lebermooses *Sphaerocarpus donnellii* ($2n = 14 + X + Y$) vom mittleren Pachytän bis zur Metaphase I untersucht. Die beiden Geschlechtschromosomen zeigen mindestens vom mittleren Pachytän ab Distanzkonjugation und werden ausnahmslos präreduziert. Im Pachytän und Diplotän ist ein ungewöhnlich großer, inhomogener Nucleolus vorhanden, gegen den die Enden der Bivalente ausgerichtet sind und mit dem die Bivalente an je einem Ende in fester Verbindung stehen. Ob die Bivalente im Diplotän Chiasmen besitzen, ist ungeklärt. Unmittelbar nach dem Diplotän sind sie stark verkürzt und sitzen in charakteristischer Weise dem Nucleolus an. An ihnen läßt sich jetzt je ein Feulgen-negativer, chromosomenförmiger, häufig längsgeteilter Eliminationskörper erkennen, der vom Bivalent stammt und zunächst eine Hülle um dieses bildet. Die beiden Bivalentpartner erscheinen durch ihn indirekt miteinander verbunden; dagegen weisen sie häufig keine Stellen

direkten gegenseitigen Kontakts auf, also auch keine sichtbaren Chiasmen. In der Metaphase I zeigen sie unmittelbaren, terminalen Kontakt miteinander. Die Eliminationskörper lösen sich (zusammen mit dem Nucleolus) in der späten Diakinese auf. Sie sind offenbar den bei Arthropoden beschriebenen Eliminationskörpern gleichzusetzen. Das Wesen und die Bedeutung von Eliminationskörpern werden abschließend allgemein besprochen.

Literatur

- BAUER, H.: Die wachsenden Oocytenkerne einiger Insekten in ihrem Verhalten zur Nuklealfärbung. *Z. Zellforsch.* 18, 254—298 (1933). — COOPER, K. W.: The nuclear cytology of the grass mite, *Pediculopsis graminum* (REUT.), with special reference to karyomerokinesis. *Chromosoma* (Berl.) 1, 51—103 (1939). — FOGG, L. C.: A study of chromatin diminution in *Ascaris* and *Ephesia*. *J. Morph.* 50, 413—444 (1930). — JACOBSON, W., and M. WEBB: The two types of nucleic acid during mitosis. *J. Physiol. (Lond.)* 112, 2—4 (1951). — The two types of nucleoproteins during mitosis. *Exp. Cell Res.* 3, 163—183 (1952). — ILLERT, G.: Die Meiose in der Spermatogenese von *Aphrophora salicina* (GOEZE). *Chromosoma* (Berl.) 7, 608—619 (1956). — KAWAGUCHI, E.: Zytologische Untersuchungen am Seidenspinner und seinen Verwandten. I. Gametogenese von *Bombyx mori* L. und *Bombyx mandarina* M. und ihrer Bastarde. *Z. Zellforsch.* 7, 519—552 (1928). — KLINGSTEDT, H.: Digametrie beim Weibchen der Trichoptere *Limnophilus decipiens* Kol. *Acta zool. fenn.* 10, 1—69 (1931). — KNAPP, E.: Untersuchungen über die Wirkung von Röntgenstrahlen an dem Lebermoos *Sphaerocarpus* mit Hilfe der Tetradenanalyse. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* 70, 309—349 (1935). — Zur Genetik von *Sphaerocarpus* (Tetradenanalytische Untersuchungen). *Ber. dtsch. bot. Ges.* 54, (58)—(69) (1936). — Crossing over und Chromosomenreduktion. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* 73, 409—418 (1937). — KNAPP, E., u. E. MÖLLER: Tetradenanalytische Auswertung eines 3-Punktversuchs bei *Sphaerocarpus donnellii* AUST. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* 87, 298—310 (1955). LORBEER, G.: Die Zytologie der Lebermoose mit besonderer Berücksichtigung allgemeiner Chromosomenfragen. I. Teil. *Jb. wiss. Bot.* 80, 567—817 (1934). — PATAU, K.: Cytologische Untersuchungen an der haploid-parthenogenetischen Milbe *Pediculoides ventricosus* NEWP. *BERL. Zool. Jb., Abt. allg. Zool. u. Physiol.* 56, 277—322 (1936). — RIS, H., and R. KLEINFELD: Cytochemical studies on the chromatin elimination in *Solenobia* (Lepidoptera). *Chromosoma* (Berl.) 5, 363—371 (1953). — SCHÄFFER, K.: Zur Diagnose der Eliminationssubstanz bei der Eireifung von Schmetterlingen (*Solenobia*). Vorläufige Mitteilung. *Rev. suisse Zool.* 51, 437—441 (1944). — SCHRADER, F.: Mitose. Wien 1954. 150 S. — SERLER, J.: Das Verhalten der Geschlechtschromosomen bei Lepidopteren. *Arch. Zellforsch.* 13, 159—269 (1914). — Geschlechtschromosomenuntersuchungen bei Psychiden. IV. Die Parthenogenese der Psychiden. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* 31, 1—99 (1923). — SOKOLOV, I.: Untersuchungen über die Spermatogenese bei den Arachniden. V. Über die Spermatogenese der *Parasitidae* (= *Gamasidae*, *Acari*). *Z. Zellforsch.* 21, 42—109 (1934).

Dr. ALOIS REITBERGER,
Zweigstelle Rosenhof des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung,
Ladenburg bei Heidelberg

